
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

MÉCANISME DE LA COMBUSTION DES CORPS TERNAIRES

PAR UN GROUPE DE MICROBES AÉROBIES

PAR M. A. PÉRÉ

Pharmacien-major de 1^{re} classe

PREMIER MÉMOIRE

Travail du laboratoire de Chimie biologique de la Sorbonne, à l'Institut Pasteur.

Quels sont les procédés mis en œuvre par les microbes aérobies pour accomplir la combustion des corps ternaires ?

Il est bien vraisemblable que cette combustion ne s'effectue pas en une seule fois, par une oxydation intégrale et soudaine qui réaliserait d'emblée toute l'énergie accumulée dans la matière alimentaire. Nous comprenons mieux qu'elle s'effectue plutôt par une série d'oxydations plus ou moins profondes, ramenant graduellement le corps ternaire à des formes intermédiaires de plus en plus simples, pour aboutir enfin aux corps brûlés.

Ce que nous savons des mucédinées¹ milite en faveur de cette opinion. Bien que ces êtres soient, à juste titre, regardés comme des comburants énergiques, ils ne brûlent jamais d'un seul coup les corps ternaires : ils produisent toujours, durant cette combustion, un corps intermédiaire, l'acide oxalique, qui est brûlé à son tour lorsqu'a disparu ou est devenu plus rare le sucre générateur.

1. DUCLAUX : *Chimie biologique*, page 249.

Si les mucédinées, les mycodermes et les levures ont fait l'objet d'études approfondies, dans l'ordre d'idées qui nous occupe, il semble que l'attention des biologistes se soit moins arrêtée sur les bactéries aérobies, capables de vivre à la manière des mucédinées et d'aboutir comme elles aux corps brûlés, grâce à l'intervention de l'oxygène de l'air dans les réactions qu'elles provoquent. La question n'est cependant pas secondaire. Nous sentons très bien que la découverte et l'étude des produits intermédiaires formés dans le cours d'une combustion microbienne seraient parfois susceptibles de nous révéler le mécanisme même de cette combustion et, par là, de nous initier, dans une certaine mesure, à la connaissance des phénomènes profonds de la vie cellulaire.

Il y a plus : l'intérêt réel et intrinsèque d'une telle étude se double d'un certain intérêt philosophique lorsque, envisageant les réactions chimiques de la vie, non seulement chez les microbes, mais chez tous les êtres, nous cherchons à rapprocher la combustion des corps ternaires par les microbes de leur synthèse par les végétaux.

Sur cette dernière, bien rares aussi se font les notions concrètes en regard des ingénieux aperçus de M. Beyer. S'il est démontré par l'expérimentation que les plantes vertes absorbent l'acide carbonique de l'atmosphère pour en retenir le carbone, si des arguments de fait représentent l'aldéhyde formique comme le premier échelon dans cette marche ascendante du carbone, les données nous font défaut pour suivre la transformation de cette aldéhyde en une hexose. Nous pouvons aussi bien supposer que cette transformation est le résultat immédiat d'une polymérisation directe, englobant six molécules de formaldéhyde dans un mouvement unique de condensation ; ou bien, qu'elle résulte d'une polymérisation en deux temps, qui produirait d'abord, à titre intermédiaire, un sucre à trois atomes de carbone, isomérique de l'aldéhyde glycérique et de la dioxycétone.

Tout donc, ou presque tout, est resté problématique dans l'histoire physiologique des corps ternaires naturels, dans le mécanisme de leur synthèse dans les végétaux et dans le mécanisme de leur combustion par les microbes aérobies.

Sans doute, le rapprochement établi ici ne saurait impliquer

l'idée d'une connexion très étroite entre les deux questions : je ne veux nullement dire que les plantes et les microbes aérobies, pour arriver à leurs fins opposées, suivent nécessairement une marche parallèle, et que les stades successifs dans la voie synthétique soient identiques aux divers stades de la combustion. Néanmoins, il me paraît que la conception de M. Bæyer dans le domaine de la physiologie végétale suscite, dans le domaine de la microbiologie, les remarques et l'hypothèse suivantes : si le procès nutritif des plantes vertes est tel que nous l'avons imaginé, s'il est vrai que ces végétaux font d'abord de l'aldéhyde formique, puis des trioses, pour arriver jusqu'aux hexoses et pour monter plus haut, ne devient-il pas vraisemblable que les microbes pourront aussi faire des trioses et de l'aldéhyde formique ? Non plus, sans doute, par un travail de construction qui accumulerait de l'énergie en partant des corps brûlés, puisque ces êtres dépourvus de chlorophylle ne sauraient emmagasiner l'énergie solaire, mais, au contraire, par des réactions dislocatrices et exothermiques qui aboutiraient aux corps brûlés, en s'attaquant aux hexoses, ou, en général, aux corps ternaires complexes créés par les végétaux à titre de réserves ?

Je voudrais essayer de mettre cette hypothèse en contact avec la réalité des faits. J'essaierai de montrer que non seulement les microbes dont il est question font un sucre à 3 atomes de carbone, mais encore que ce sucre représente un terme de passage inévitable où tous les corps ternaires complexes, hydrates de carbone et alcools polyatomiques, viennent se rencontrer fatalement dans leur mouvement régressif de combustion.

Mais s'ils suivent la même voie, ces corps ternaires complexes y débouchent par des moyens différents, suivant la constitution chimique qui leur est propre : les hydrates de carbone complexes sont préalablement dédoublés en hexoses, par l'action des diastases hydratantes ; tandis que les alcools polyatomiques, subissant d'abord une oxydation ménagée, sont transformés en sucres, aldoses ou cétooses, construits sur le même nombre d'atomes de carbone que l'alcool générateur. Puis, tous ces sucres, quelles que soient leur origine, leur constitution chimique et leur structure moléculaire, sont invariablement ramenés sous la forme d'un sucre à 3 atomes de carbone, unique pour

tous, qui fait tourner vers la gauche le plan de polarisation. Enfin, ce sucre est lui-même brûlé, mais non sans que nous ne puissions observer la formation concomitante d'aldéhyde formique, comme produit transitoire. Si bien que l'étude biologique de ces microbes aérobies nous mettra en situation de suivre, étape par étape, la marche rétrograde du carbone organique depuis les corps complexes synthétisés par les végétaux, tels que l'amidon et la mannite, jusqu'aux corps brûlés, en passant par les corps aldéhydiques en C^{12} , en C^6 , en C^3 et en C^1 : marche rigoureusement parallèle à celle que nous attribuons au carbone inorganique, lorsqu'il est puisé dans l'atmosphère et mis en œuvre par les végétaux.

Avant d'entrer dans le détail de ces expériences, je dois dire un mot des microbes étudiés et des liquides de culture que j'ai employés.

1° *Tyrophrix tenuis*. — Les spores de ce microbe, que je conserve depuis plusieurs années dans des ampoules scellées, me venaient des laboratoires de l'Institut Pasteur. Je me suis assuré que le microbe possédait bien les caractères extérieurs et les propriétés biologiques que M. Duclaux lui a reconnus : en particulier il m'a donné de l'acide valérianique, aux dépens de la caséine du lait, qu'il avait préalablement précipitée, puis dissoute et digérée.

2° *Bacillus mesentericus vulgaris*.

3° *Bacillus subtilis*.

J'ai isolé ces deux microbes des macérations de foin, par le procédé classique. Ils présentaient les caractères de forme et de culture sous lesquels on les a décrits.

Ces trois microbes se développent, comme on sait, à la surface des liquides de culture, sous la forme d'un mince voile, ou d'une membrane plus ou moins épaisse. Ils sont réputés aérobies. Les propriétés comburantes du premier vis-à-vis des matières albuminoïdes ont été déjà mises en évidence par M. Duclaux.

Dans le cours de ces expériences, ce n'étaient point les spores, mais les individus adultes qui étaient introduits dans les liquides à étudier. Les spores étaient ensemencées dans du bouillon de viande qui fournissait, après 4 jours d'incubation, le microbe originel.

Le but visé dans ces recherches, qui était de découvrir les corps intermédiaires, m'obligeait à recourir à des liquides de culture dans lesquels la combustion des corps ternaires fût très ménagée ; d'autre part, pour arriver à la combustion totale et intégrale de ces mêmes corps, il me fallait employer des liquides favorisant l'action comburante des microbes.

J'ai rempli cette double indication en employant l'azote ammoniacal lorsque je procédais à la recherche des corps intermédiaires d'un édifice moléculaire élevé, et l'azote organique lorsqu'il s'agissait d'arriver à la combustion complète.

Liquide de culture à azote ammoniacal.

Phosphate d'ammoniaque pur.....	1 gr.	} pour 100 c. c.
Sulfate d'ammoniaque pur.....	0,50	
Phosphate de potasse.....	0,20	

Dans ce liquide, additionné du corps ternaire à étudier, les microbes poussent très bien à la condition qu'il soit bien neutre ; si la réaction était légèrement acide après la stérilisation à l'autoclave, il suffirait d'ajouter une ou deux gouttes d'ammoniaque : un léger excès de cet alcali ne nuit pas.

Liquide de culture à azote organique.

Ce liquide est du bouillon de viande, fait avec 1 partie de viande pour 2 parties d'eau.

Les cultures se faisaient à 34-35°.

I

Parmi les corps ternaires naturels, les alcools polyatomiques sollicitaient l'attention à un titre tout particulier, pour cette raison que leur constitution chimique les éloigne davantage des corps brûlés, et par conséquent les rend plus aptes que les autres corps ternaires à fournir, par oxydation, des termes de passage avant leur combustion complète.

Nous savons d'ailleurs que les agents d'oxydation ménagée les transforment en sucres, aldoses ou cétooses, qui leur correspondent exactement, et dérivent d'eux par la transformation, soit de l'un des groupements alcooliques primaires en un groupe-

ment aldéhydique, soit de l'un des groupements alcooliques secondaires en un groupement cétonique.

Il était donc indiqué d'éclaircir à ce point de vue l'action oxydante de nos microbes. Par le fait, la science connaît la formation de la lévulose aux dépens de la mannite, signalée par M. Brown¹, et vient d'enregistrer le cas intéressant d'un alcool polyatomique, la sorbite, qu'un microbe transforme en sorbose².

Voici comment j'ai pratiqué cette étude sur la mannite. Le liquide de culture avait la composition suivante :

Mannite pure	20 gr.
Solution de sels ammoniacaux.....	200 c. c.

Les microbes étant ensemencés dans cette solution neutre, les ballons étaient maintenus pendant 30 jours à l'étuve. Je distillais, en substituant l'acide citrique à l'acide tartrique habituellement employé pour retenir l'ammoniaque et mettre en liberté les acides volatils. Le résidu de la distillation était évaporé à sec, au bain-marie, puis repris par 60 c. c. d'eau distillée. Cette solution ainsi que le liquide passé à la distillation étaient étudiés au point de vue de la présence des corps aldéhydiques.

Voici les résultats observés : pour les trois microbes, la solution du résidu réduit la liqueur de Fehling et est optiquement active ; mais tandis que le *Tyrothrix tenuis* et le *Bac. mesentericus vulg.* laissent un corps dextrogyre, le *Bac. subtilis* a laissé un corps lévogyre :

Déviation observée au tube de 20 c. c., avec la sol. du résidu.

<i>Tyrothrix tenuis</i>	$\alpha = + 1^{\circ} 4'$
<i>Bac. mesentericus vulg.</i>	$\alpha = + 1^{\circ} 12'$
<i>Bac. subtilis</i>	$\alpha = - 32'$

Nos microbes ont donc formé des sucres fixes aux dépens de la mannite ; les deux premiers, probablement la *d.* mannose, et le troisième, probablement la lévulose ; ces deux sucres étant ceux qui prennent conjointement naissance lorsqu'on oxyde la mannite par le brome ou par l'acide azotique.

L'action de la phénylhydrazine acétique confirme ces vues.

1. Voir FERNBACH, Revues et analyses, dans ces *Annales*, 1888.

2. M. BERTRAND, Communication à l'Académie des Sciences, 20 avril 1896.

Avec les solutions dextrogyres, j'ai obtenu, à froid, bien que lentement et en petite quantité, un précipité cristallisé d'hydrazone, ce qui est un caractère de la mannose; et à chaud, une osazone cristallisée dont le point de fusion est très voisin de 210° .

Avec la solution lévogyre fournie par le *bac. subtilis*, je n'ai pas obtenu de précipité à froid; mais, à chaud, il s'est formé un faible précipité cristallisé dont le point de fusion est voisin de 205° .

Mais ce n'est pas tout, et l'étude du liquide passé à la distillation n'est pas moins intéressante.

Avec les cultures des trois microbes, le liquide distillé, qui est acide, réduit fortement la liqueur cupro-sodique et dévie à gauche le plan de rotation. Si on le distille une deuxième fois, après neutralisation par le carbonate de chaux, il fournit un produit neutre qui possède les propriétés réductrices et le pouvoir optique du précédent.

Angle de déviation des liquides distillés.

Avec le <i>Tyrophrix tenuis</i>	$\alpha = - 2^{\circ}28'$
— <i>Bac. mesentericus vulgatus</i>	$\alpha = - 2^{\circ}16'$
— <i>Bac. subtilis</i>	$\alpha = - 1^{\circ}10'$

Il s'est donc formé aux dépens de la mannite, en même temps que les hexoses, un corps aldéhydique volatil dont la molécule est dissymétrique.

C'est qui éveille au plus haut point l'attention, les solutions de cette aldéhyde, à l'inverse des solutions d'aldéhydes simples, ne colorent pas la solution sulfureuse de fuchsine : d'où naît cette présomption que l'aldéhyde en question est à fonction complexe, et pourrait bien renfermer dans sa molécule asymétrique le groupement mixte $\text{CH.OH} - \text{CHO}$, tout comme les aldoses également asymétriques et également indifférentes vis-à-vis du réactif précité.

En somme, nos microbes ont produit aux dépens de la mannite deux corps réducteurs et optiquement actifs : une hexose, qui est dextrogyre ou lévogyre suivant le microbe mis en jeu; et un corps aldéhydique volatil, lévogyre, quel que soit le microbe générateur, et qui possède les propriétés générales des aldoses. Nous en ferons plus loin une étude plus complète.

Les petites quantités de sucres fixes retrouvées dans les liquides de culture, l'apparition dans ces liquides d'un corps aldéhydique volatil, donnent à penser que les hexoses entrent elles-mêmes en réaction sitôt formées, et, de plus, que l'aldéhyde volatile ne proviendrait nullement de l'attaque directe de la mannite, mais plutôt de l'attaque directe des hexoses : que ces hexoses, en un mot, constitueraient des produits transitoires.

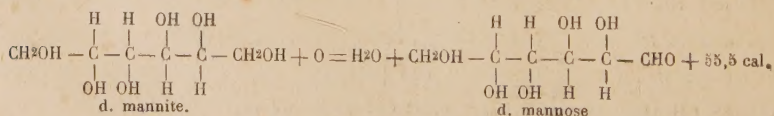
Si cette manière de voir est exacte, il se peut que, dans des conditions de culture tout autres, la mannite soit détruite sans que nous puissions retrouver les hexoses qu'elle engendre. C'est ce que l'observation vient démontrer. Si nous substituons le bouillon de viande à la solution des sels ammoniacaux sans modifier en rien, par ailleurs, les conditions de culture, nous ne trouvons plus de sucres fixes dans le résidu de la distillation ; mais par contre, le produit de la distillation est réducteur et lévogyre, comme dans l'expérience précédente.

Après 30 jours d'incubation :

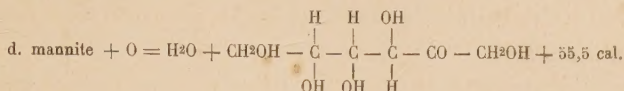
	Liquide distillé.
Avec le <i>Tyrophrix tenuis</i>	$\alpha = - 1044'$
— <i>Mesentericus vulg.</i>	$\alpha = - 1052'$
— <i>Bac. subtilis</i>	$\alpha = - 1012'$

Rien ne montre plus clairement combien important les conditions de culture et particulièrement la composition du milieu nutritif dans l'étude des produits intermédiaires : puisque cette dernière expérience tendrait à nous suggérer que la formation de l'aldéhyde volatile marque le premier stade de la combustion de la mannite, alors que ce premier stade est marqué par la formation des hexoses.

Remarquons que l'apparition de ces sucres dans le liquide minéral implique l'intervention de l'oxygène de l'air, ainsi qu'un dégagement de chaleur. La chaleur de combustion de la mannite étant de 728,5 calories, et celle des hexoses de 673 calories, la réaction qui donne naissance aux hexoses peut être figurée par les expressions suivantes :



et pour la lévulose :



Ainsi le carbone est respecté, l'atome d'oxygène qui intervient se porte sur l'hydrogène exclusivement, soit que cet hydrogène appartienne au groupement alcoolique secondaire, d'où la production de lévulose, soit qu'il appartienne au groupement alcoolique primaire, d'où la production de mannose.

II

Les relations de fonction et de structure qui existent entre la mannite et les sucres qui en dérivent, impriment, *a priori*, à l'étude de l'érythrite et de la glycérine un intérêt marqué. Il est évident que l'oxydation ménagée, provoquée par nos microbes, de ces alcools inactifs par symétrie moléculaire, suffirait pour introduire la dissymétrie dans leur molécule, et pour les transformer par conséquent en sucres doués du pouvoir rotatoire, construits sur 4 atomes et sur 3 atomes de carbone comme les alcools générateurs.

L'expérimentation ne vient pas confirmer ces vues, quant à l'érythrite naturelle qui, peut-être à cause même de sa structure, résiste à toute attaque. Dans la solution de sels additionnée d'érythrite, la semence n'a pu se développer; et dans le bouillon additionné d'érythrite, le développement s'est fait aux dépens des éléments nutritifs du bouillon : même après 15 ou 20 jours de culture, je n'ai pu retrouver aucun corps réducteur, ni aucun corps optiquement actif.

Il en est tout autrement avec la glycérine qui, elle, est attaquée quelle que soit la qualité de l'azote alimentaire.

J'ai agi sur 100 c. c. de liquide renfermant 5 grammes de glycérine. Après 30 jours d'incubation, ces liquides, étudiés comme je l'ai indiqué pour la mannite, ne m'ont pas donné de sucre fixe, mais les liquides recueillis à la distillation étaient réducteurs et lévogyres :

Bouillon glyciné à 5 % avec le *Tyrophrix tenuis*. $\alpha = - 1^{\circ}36'$

1. Les liquides distillés provenant des cultures du *Bac. mesentericus vulg.* et du *Bac. subtilis* étaient aussi réducteurs et lévogyres.

J'ajouterai que ces solutions aldéhydiques sont sans action sur la solution sulfureuse de fuchsine.

Il nous est donc permis de conjecturer, d'une part, que ce corps réducteur volatil et lévogyre est identique à celui que fournissent les cultures avec la mannite; d'autre part, qu'il joue vis-à-vis de la glycérine le rôle de la mannose vis-à-vis de la mannite : nous serions ainsi en présence d'un sucre à 3 atomes de carbone doué du pouvoir rotatoire, la glycérose aldéhydique lévogyre.

C'est là un point qu'il importe évidemment d'éclaircir de très près. Et comme, ainsi qu'on le verra plus loin, je n'ai pu isoler ce corps à l'état de pureté absolue pour déterminer directement son poids moléculaire; comme, de plus, les composés hydraziniques qu'il m'a donnés ne se prêtent pas à l'analyse, j'ai cherché des documents dans l'étude des corps fournis par les agents de réduction et les agents d'oxydation.

Je suis parti parallèlement des solutions pures¹ d'aldéhyde fournies par l'action du *Tyrothrix tenuis* sur la mannite et sur la glycérine : disons tout de suite que ces solutions se sont conduites de même.

Si on les traite par l'amalgame de sodium à 1 0/0 en présence de traces d'acide chlorhydrique, l'on observe que leur pouvoir optique diminue à mesure que diminue leur pouvoir réducteur : si bien que l'inactivité optique est acquise lorsqu'ont disparu leurs propriétés réductrices. Il s'est donc formé un alcool ou des alcools dont la molécule est symétrique.

Le liquide neutre est distillé au réfrigérant ascendant, et le produit, qui représente 10 0/0 du liquide total, est étudié au compte-gouttes de M. Duclaux. Voici les résultats :

Alcool en volume	Nombre de gouttes
déterminé par la méthode du flacon	à 15°
2 0/0 ¹	126 1/2

Ce chiffre se rapproche du chiffre spécifique de l'alcool isopropylique (122); mais l'écart, qui est notable, vu la sûreté de la méthode, faisait soupçonner un mélange et prescrivait une étude

1. J'entends par solutions pures d'aldéhyde celles qui proviennent d'une double distillation des cultures : la première après addition d'acide citrique pour retenir l'ammoniaque; la deuxième, après neutralisation au carbonate de chaux pour retenir les acides volatils qui sont passés à la première.

plus complète. J'ai donc réduit et distillé comme ci-dessus de nouvelles quantités de solution aldéhydique, et les diverses fractions recueillies étant réunies, j'ai saturé par le carbonate de potasse sec. J'ai pu séparer ainsi environ 2 c.c. 1/2 d'un liquide à odeur alcoolique et éthérée, rappelant celle de l'acétone pure.

Distillé au bain-marie, dans un tube à essais muni d'un thermomètre, ce liquide passe à 86°-87°, et laisse des traces d'un résidu liquide qui dégage l'odeur piquante et alliée de l'alcool *allylique*.

Enfin, le produit rectifié est dilué à 40 c.c. ; une partie de ce mélange est directement traitée par l'iode et le carbonate de soude, suivant les indications de M. Müntz ; il se forme des traces à peine sensibles d'iodoforme qui troublent très faiblement le liquide après refroidissement, mais que le microscope permet de reconnaître ; la deuxième part du liquide, égale à la première, est distillée après addition de bichromate de potasse et d'acide sulfurique en proportion très faible ; et cette nouvelle liqueur est traitée par le procédé de M. Müntz : j'ai obtenu cette fois, à chaud, un abondant précipité d'iodoforme qui témoigne de la formation d'acétone par l'oxydation de l'alcool étudié. Dès lors nous sommes complètement fixés puisque toutes ces indications convergent : la réduction du corps aldéhydique a fourni de l'alcool *isopropylique* mêlé d'une faible quantité d'alcool *allylique* et de traces d'acétone.

Ce renseignement est incomplet et incertain, puisque aucune aldéhyde dissymétrique ne saurait correspondre directement à ces alcools ; mais sa signification n'en est pas moins précieuse. Il est infiniment probable que notre aldéhyde est construite sur 3 atomes de carbone comme les alcools qui en dérivent ; et de plus que ceux-ci résultent d'une réduction trop profonde : il devient, par suite, probable aussi que l'alcool correspondant à notre aldéhyde, s'il n'a pas été complètement entraîné par le mouvement de réduction, doit se retrouver dans le liquide qui n'a pas traversé le réfrigérant pendant la distillation.

Les résidus de ces distillations sont donc réunis, puis complètement évaporés dans le vide sec. Il reste des cristaux de chlorure de sodium que je lave avec un mélange à parties égales d'alcool et d'éther anhydres. Par évaporation à une douce chaleur, ce mélange abandonne en petite quantité un sirop soluble dans

l'alcool, insoluble dans l'éther, et qui fournit, par distillation sur l'anhydride phosphorique, de l'*acroléine* facile à reconnaître à ses caractères si marqués et à ses propriétés réductrices. Le liquide sirupeux était constitué par de la *glycérine*.

Voici que nos présomptions s'affirment et se précisent, puisqu'à la glycérine correspond une aldéhyde dissymétrique.

Voyons maintenant où vont nous conduire les agents d'oxydation.

Par distillation des solutions lévogyres avec le bichromate de potasse et l'acide sulfurique, j'ai obtenu uniquement des corps optiquement inactifs, parmi lesquels l'acide formique et des traces d'une aldéhyde simple.

Par l'oxyde d'argent, à la température de 80°-90°, j'ai obtenu un sel cristallisé facile à déterminer :

Poids du sel = 0,1212. Argent obtenu : 0,0786 soit : 64,70 0/0

Calculé pour $C^2H^3AgO^2 = 64,67\ 0/0$

Ces procédés d'oxydation trop énergiques disloquent donc la molécule; mais les résultats sont tout autres par l'emploi de l'acide azotique étendu.

100 c.c. de solution d'aldéhyde, produisant un angle de déviation de 2°-3°, sont additionnés de 5 c.c. d'acide azotique pur. On chauffe au bain-marie progressivement jusqu'à ce que la réaction commence, ce qui est rendu visible par la coloration verte du mélange et le dégagement de quelques bulles de gaz. On continue l'évaporation sans dépasser 75° à 80°, en modérant au besoin la réaction par de légères affusions d'eau froide. Lorsqu'il ne reste plus que 5 à 6 c.c. de liquide, l'évaporation est continuée dans le vide sec sur la chaux; et on chasse complètement l'excès d'acide azotique par deux additions d'eau (5 à 6 c.c.) suivies de concentrations dans le vide sec.

Il reste un sirop de saveur acide franche dont les solutions sont *dextrogyres* et restent *dextrogyres* après neutralisation par les alcalis. J'ai préparé les sels de chaux, de baryte et de plomb : le premier réduit la liqueur de Fehling, ainsi d'ailleurs que le fait l'acide libre par une ébullition prolongée.

Quant aux sels de plomb et de baryte, j'ai inutilement essayé de les obtenir sous la forme cristallisée par évaporation sous le dessiccateur. La solution plombique laisse bien se séparer d'abord

quelques grains cristallisés, durs et pesants, mais bientôt le liquide se prend en masse gommeuse. Si on reprend le mélange par l'eau froide en petite quantité, on arrive à séparer la poudre cristalline qui est peu soluble. Après dessiccation, le dosage du plomb a donné :

Poids du sel = 0gr,032; sulfate de plomb obtenu : 0,0232.

Correspondant à Pb = 49,40 0/0; calculé pour $(C^3 H^5 O^4)^2 Pb$: 49,64 0/0.

Le sel de baryte n'a pas cristallisé sous le dessiccateur; sa solution aqueuse a donné, par l'alcool, un précipité en partie amorphe, en partie cristallin dans lequel j'ai dosé la baryte.

1. Précipité cristallin qui s'est déposé sur les parois, après la formation du précipité amorphe :

Poids du sel = 0,0226; sulfate de baryte obtenu : 0,0154.

Correspondant à Ba : 40 0/0. Calculé pour $(C^3 H^5 O^4)^2 Ba$ 39,48 0/0.

2. Précipité amorphe immédiatement formé par l'alcool.

Poids du sel lavé à l'alcool et desséché : 0,4016.

Poids du sulfate de baryte obtenu : 0,0660.

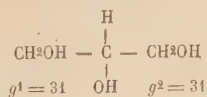
Correspondant à Ba = 39.83 0/0.

Nous avons bien affaire à l'acide glycérique droit.

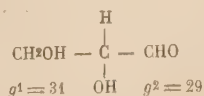
Notre aldéhyde prend donc sa place entre la glycérine et l'acide glycérique : en outre du groupement spécifique CHO, elle renferme encore, comme la glycérine et l'acide glycérique, les groupements spécifiques des fonctions alcool primaire et alcool secondaire ; c'est une aldose à 3 atomes de carbone.

Remarquons en passant le cas curieux de cette aldéhyde déviant à gauche, qui correspond et aboutit effectivement à un alcool optiquement inactif et à un acide déviant à droite.

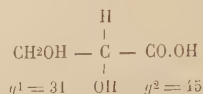
Nous relevons l'inactivité optique avec $g^1 = g^2$, la transformation du groupement aldéhydique en un groupement alcoolique ayant ramené la symétrie dans la molécule :



et l'aldéhyde étant lévogyre avec $g^1 > g^2$:



l'acide devient dextrogyre avec $g^1 < g^2$:



c'est-à-dire que l'interversion dans la valeur relative des deux groupements envisagés coïncide avec l'interversion dans le sens du pouvoir rotatoire.

Or ces coïncidences sont bien conformes, non-seulement aux idées actuelles sur les relations qui existent entre le pouvoir rotatoire et la présence du carbone asymétrique, mais aussi à l'une des notions que les recherches de M. Guye tendent à introduire dans la science¹.

Le mécanisme de la combustion des alcools polyatomiques se trouve singulièrement éclairé par ces recherches, tout au moins dans sa première phase : ces corps sont transformés en sucres renfermant un nombre d'atomes de carbone égal à celui de l'alcool générateur, puis ces sucres sont eux-mêmes transformés en glycérose lévogyre. Il est bien évident qu'avec la glycérine, les deux termes se confondent, puisque le sucre qui lui correspond est précisément cette glycérose.

Il faut noter que notre étude s'est bornée à celle des alcools polyatomiques naturels qui renferment deux fois le groupement alcoolique primaire. Il serait éminemment intéressant de rechercher ce qu'il adviendrait des alcools polyatomiques ne renfermant qu'un seul groupement CH^2OH : nous sommes, en effet, en droit d'espérer que ces corps, tels que le butylglycol et le propylglycol, s'ils peuvent, au même titre que la mannite et la glycérine, entrer dans le processus nutritif de nos microbes, nous fourniront des corps aldéhydiques doués du pouvoir rotatoire, dont le premier, construit en C^1 , serait un stéréoisomère de l'*aldol* de Wurtz; dont le second en C^3 , homologue inférieur du précédent, correspondrait à un acide éthylidénolactique optiquement actif. Je pousse mes recherches dans cette voie.

III

Avant de revenir aux recherches biologiques, je crois devoir dire quelques mots des propriétés de cette glycérose.

1. GUYE. Sur le produit d'asymétrie. Thèse, 1892.

Cette digression se justifie par ce fait que le caractère de stabilité ou d'instabilité de ce corps vis-à-vis des agents physico-chimiques pourra nous fournir quelques indications utiles sur le point de savoir s'il réagira, et comment il réagira, vis-à-vis des microbes qui lui donnent naissance.

Les essais faits en vue de l'obtenir à l'état pur et sec n'ont pas complètement réussi. Il passe presque régulièrement avec l'eau dans la distillation; il se disloque lorsqu'on le distille sur le chlorure de calcium fondu, sans doute à cause de la faible alcalinité que possède souvent ce produit : les distillations fractionnées ne nous sont d'aucun secours.

L'éther ne l'enlève pas à ses solutions aqueuses; il ne forme pas de composés cristallisés avec le bisulfite de soude ou l'ammoniaque, à l'inverse des aldéhydes simples que l'on peut, grâce à cela, isoler et purifier.

Je me suis donc arrêté jusqu'ici au procédé suivant : les solutions pures de glycérose obtenues par la double distillation des cultures sont concentrées dans le vide sec, ce qui entraîne des pertes très notables. Lorsque ces solutions produisent un angle de déviation voisin de -5° , je les additionne de carbonate de potasse sec : la glycérose se sépare lentement, en gouttelettes huileuses qui se réunissent à la surface du liquide.

Mais le produit n'est pas pur, comme l'indique sa réaction fortement alcaline : il retient une proportion quelconque de solution alcaline, sur laquelle on ne saurait le rectifier. Après décantation, j'ajoute, jusqu'à neutralisation exacte, de l'acide tartrique en solution alcoolique, puis un volume d'un mélange à parties égales d'alcool et d'éther anhydres. Après 48 heures de repos, il suffit de filtrer pour obtenir une solution neutre de glycérose, d'où l'on chasse facilement l'éther. Il est malheureusement plus difficile de chasser l'eau et l'alcool qui s'y trouvent encore mêlés : on observe en effet, lorsqu'on abandonne le mélange sous le dessiccateur, que le pouvoir rotatoire varie incessamment et n'arrive pas à la fixité, comme si la glycérose disparaissait presque aussi vite que l'alcool et l'eau qu'elle renferme : mais il est permis de supposer que ce procédé me donnera un produit pur lorsque je pourrai disposer d'une quantité notable de matière.

Ainsi isolée, la glycérose constitue un liquide demi-sirupeux,

soluble dans l'alcool et dans l'eau, insoluble dans l'éther; sa saveur, d'abord chaude et un peu piquante, puis sucrée, rappelle la saveur de la glycérine.

La réaction de la phénylhydrazine, dans les conditions d'expérience où j'ai dû me placer, n'a rien de caractéristique. Lorsqu'on ajoute à 50 c. c. d'une solution pure et tiède de glycérose marquant un angle de -5° , des proportions convenables d'acétate de soude, d'acide acétique et de phénylhydrazine incolore, et que l'on continue à chauffer au bain-marie, il se précipite en peu de temps un liquide huileux qui par le refroidissement se prend en masses cireuses. Mais si on laisse agir la phénylhydrazine à froid, il se produit un trouble laiteux, et après 2 ou 3 minutes, on voit se former sur les parois du vase des prismes transparents et incolores; quelques légères secousses imprimées au liquide suffisent alors pour provoquer une abondante cristallisation. Nous avons là une hydrazone cristallisée.

Mais cette hydrazone s'altère rapidement. Elle jaunit déjà dans le sein du liquide où elle s'est formée, brunit fortement pendant les lavages et sous le dessiccateur, il arrive même, si on essaie de la pulvériser après dessiccation, qu'elle prenne en partie la consistance demi-visqueuse. Aussi les seuls renseignements que je puisse donner sont que ses solutions dévient à gauche, et que son point de fusion n'est pas éloigné de 73° .

Nous sommes loin des résultats que nous pouvions espérer, d'après les résultats mêmes de M. Fischer. Je ferai seulement remarquer à ce sujet que j'ai agi sur des solutions de glycérose d'une concentration quelconque et sans doute encore très étendues; que cette glycérose est l'aldéhyde glycérique sous une de ses formes stéréoisomériques, tandis que la glycérose de M. Fischer est surtout constituée par la dioxyacétone; et enfin qu'il est bien possible que, malgré mes efforts dans ce sens, je n'aie pas encore acquis l'habileté nécessaire pour dominer ces délicates réactions.

Je tenais cependant à signaler toutes ces lacunes que je m'efforcerai de combler, parce que leur disparition nous permettrait de vérifier si cette glycérose d'origine microbienne pourrait se polymériser en une hexose, ou entrer en réaction avec la dioxyacétone pour donner naissance à la fructose de M. Fischer;

pour vérifier aussi si la réaction de Kiliani-Fischer nous permettrait la synthèse d'un sucre à 4 atomes de carbone en partant de ce sucre à 3 atomes.

La glycérose possède un pouvoir rotatoire *spécifique* pour une même température :

Solution initiale.....	$\alpha = - 4^{\circ}24'$
— à 50 %/o	$\alpha = - 2^{\circ}12'$
— à 25 %/o.....	$\alpha = - 1^{\circ}6'$
— à 10 %/o.....	$\alpha = - 0^{\circ}26''$

La glycérose réduit énergiquement la liqueur de Fehling, à chaud, ainsi que la solution ammoniacale de nitrate d'argent. Même à froid, elle réduit instantanément la solution alcaline d'iodure double de mercure et de potassium.

Les alcalis la brunissent et la détruisent rapidement, à une température peu élevée : chauffée vers 70° avec de la chaux, elle est presque instantanément et entièrement disloquée; le liquide renferme alors du formiate de chaux.

Les acides minéraux, même très étendus, l'attaquent à chaud : la liqueur acquiert la propriété de colorer les solutions sulfureuses de fuchsine.

La radiation solaire l'atteint rapidement : une solution dont l'angle de déviation se mesurait par 2° 40', additionnée de quelques gouttes d'un lait de chaux, est devenue optiquement inactive après une journée d'insolation : le liquide renfermait du formiate de chaux.

Bien plus, la dislocation se poursuit dans l'obscurité après que la lumière solaire l'a mise en train : la même solution que ci-dessus, après 2 heures d'insolation, marquait encore — 1° 50'; maintenue ensuite dans l'obscurité, son angle de déviation après 16 heures était descendu à 54'. Je dois même dire qu'à cause de la petite quantité de chaux ajoutée, la solution était devenue neutre, et il est par conséquent très possible que l'inactivité optique eût été atteinte avec une plus forte proportion de chaux.

Si nous remplaçons la chaux par du carbonate de chaux pour maintenir la neutralité du liquide, la dislocation ne s'effectue qu'avec une grande lenteur :

8 mai 1893.	Angle de rotation initial.	$\alpha = -$	2°10'
23 mai	—	—	$\alpha = -$ 1°42'
15 juin	—	—	$\alpha = -$ 1°18'
15 juillet	—	—	$\alpha = -$ 50'
15 août	—	—	$\alpha = -$ 38'
15 septembre	—	—	$\alpha = -$ 30'

L'action comburante s'atténue considérablement à mesure que la dilution se prononce, si bien que nous ne pouvons atteindre l'inactivité optique. Il se forme ici de l'acide formique, mais aussi une aldéhyde à fonction simple qui colore fortement la liqueur sulfureuse de fuchsine déjà après le premier jour d'insolation. La persistance de la glycérose dans la liqueur ne nous a pas permis de déterminer cette aldéhyde qui est probablement l'aldéhyde formique.

Ce que nous pouvons déduire de ces documents, c'est que la glycérose lévogyre possède une tendance très accusée à entrer en réaction surtout vis-à-vis des agents d'oxydation. Elle est peu stable, et sa dislocation fournit des corps en C', l'aldéhyde ou l'acide formique. Ce sont des notions qu'il y aura lieu de se rappeler plus tard, lorsque nous étudierons l'action de nos microbes sur la glycérose.

IV

Les recherches antérieures sur les alcools polyatomiques nous conduisent naturellement à l'étude des hexoses; mais il est évident qu'avec celles-ci viendra se confondre l'étude des hydrates de carbone supérieurs, tels que l'amidon et les bihexoses, si nos microbes sécrètent les diastases capables d'hydrater et de dédoubler ces corps.

L'expérience montre bien qu'il en est ainsi.

Dans 100 c. c. de solution nutritive additionnés de 2 gr. de fécule de pomme de terre, le *Tyrophrix tenuis* s'est bien développé, et après quelques jours il était facile de constater les propriétés réductrices du liquide.

Après 30 jours, l'amidon étant complètement dissous, le liquide de culture fournit à la distillation une solution réductrice et lévogyre : il s'est donc formé de la glycérose. Quant au résidu, il est réducteur et dextrogyre; et, de plus, bien que l'iode ne lui communique aucune coloration, il fournit par l'alcool un précé-

pité que l'acide sulfurique dilué transforme à chaud en un corps qui réduit la liqueur cuprosodique.

L'amidon a donc été transformé en dextrine, en sucres fixes et en glycérose.

Si nous répétons l'expérience avec du bouillon additionné de 20/0 de fécule, l'étude du liquide, après 30 jours d'incubation, nous permet de retrouver encore la glycérose, mais non la dextrine ni les sucres fixes. Tous ces corps ne se forment qu'à titre intérimaire et sont détruits pour aboutir à la glycérose.

Le maltose est transformé en glycérose après avoir été au préalable dédoublé en glucose.

L'examen d'un bouillon additionné de 10 grammes de maltose, que j'ai pratiqué après 20 jours de culture, a donné, le résidu de la distillation étant ramené à 100 c. c., volume initial du liquide :

Déviation à $17^{\circ} = 13^{\text{d}}4$ correspondant à 2,767% de glucose.

Dosage du sucre réducteur, par réduction = 2,770% de glucose.

Tout le maltose a subi le dédoublement diastasique.

Quant au produit de la distillation, il est réducteur et lévogyre.

L'étude du sucre de canne nous arrêtera un peu plus longtemps, parce que son dédoublement donnant naissance à deux sucres isomériques, il est intéressant d'examiner si les microbes font un choix entre les deux isomères. La solution de ce point exige quelques analyses des mélanges de sucres divers : saccharose, glucose et lévulose. Ces analyses ont été pratiquées à l'aide des procédés usuels ; l'interprétation des données poursuivie à l'aide des documents consignés dans la thèse substantielle de M. Grimberty ¹.

Tyrophthrix tenuis : dans 100 c. c. de solution minérale renfermant 5 grammes de sucre de canne.

Après 30 jours d'incubation, le liquide distillé est réducteur et lévogyre : il renferme de la glycérose.

1. GRIMBERT : Fermentation anaérobie produite par le *Bacillus orthobutylicus*. Ces *Annales*, 1893.

	Pouvoirs rotatoires.	Coefficients saccharins.
Saccharose :		
	$[\alpha]_D + 67^{\circ}31$	$+ 1^{\text{sr}}620$
Glucose anhydre :		
	$[\alpha]_D + 52^{\circ}50 + 0,018796p + 0,000517p^2$	$+ 2^{\text{sr}}065$
Lévulose anhydre :		
	$[\alpha]_D - 101^{\circ}38 - 0,56t + 0,108(p - 10)$	$- 1^{\text{sr}}0719 + 0,0058t + 0,000038t^2$

Résidu de l'évaporation à sec repris par 100 c. c. d'eau :

Déviatiôn en degrés saccharimétriques.....	— 0d,46 à 17°
Sucre réducteur.....	2,05 ‰
— après interversion.....	2,05 ‰

d'où nous tirons :

Saccharose restant.....	0,00
Glucose.....	1.304
Lévulose.....	0,746

Tyrothrix tenuis : dans 100 c. c. de bouillon et 5 grammes de saccharose après 20 jours : liquide distillé réducteur et lévogyre.

Résidu porté à 100 c. c. :

Déviatiôn à 17°.....	+ 4d,10
Sucre réducteur.....	= 0gr,454 ‰
— après interversion.....	= 0gr,454 ‰

d'où :

Saccharose restant.....	= 0gr,00
Glucose.....	= 0gr,3715
Lévulose.....	= 0gr,0823

Tyrothrix tenuis : dans 100 c. c. de bouillon à 10‰ de saccharose après 30 jours : liquide distillé réducteur et lévogyre.

Résidu de la distillation porté à 100 c. c.

Déviatiôn à 17°.....	= + 4d6
Sucre réducteur.....	= 3,18 ‰
Après interversion.....	= 3,18 ‰

D'où :

Saccharose restant.....	= 0
Glucose restant.....	= 2,71
Lévulose.....	= 0,47

Dans toutes ces expériences, le *Tyrothrix tenuis* attaque de préférence le lévulose, pour laisser un résidu de glucose.

Passons au *Bacillus mesentericus vulgatus*.

Dans 100 c. c. de bouillon à 10 ‰ de saccharose après 15 jours : liquide distillé, réducteur et lévogyre.

Résidu porté à 100 c. c. donne :

Déviatiôn à 20°.....	+ 0d,2
Sucre réducteur.....	1,94 ‰
— après interversion.....	2,50 ‰

D'où :

Saccharose restant	0,532 %
Glucose.....	0,985
Lévulose.....	0,965

Après 25 jours :

Saccharose restant.....	0
Glucose.....	0,365
Lévulose.....	0

Comme le précédent, ce microbe attaque de préférence le lévulose.

Voyons s'il en serait de même avec le *Bacillus subtilis*.

Après 15 jours :

Dans 100 c. c. de bouillon renfermant 10 grammes de saccharose.

Déviatiou à 17°.....	— 94,0
Sucre réducteur.....	3,509 %
— après interversion.....	3,509

D'où :

Saccharose	0
Lévulose restant.....	1,958
Glucose.....	4,551

Après 25 jours :

Saccharose	0
Lévulose	0,650
Glucose.....	0,110

A l'inverse des deux premiers microbes, le *subtilis* attaque de préférence le glucose pour laisser un résidu de lévulose, et ainsi nous relevons une différence intéressante entre ces êtres.

Mais l'intérêt principal de ces observations resterait inaperçu, si nous ne les rapprochions des observations relatives à l'oxydation de la mannite. Or ce rapprochement met en relief cette singulière coïncidence : les microbes qui, dans le mélange des deux sucres isomériques formés aux dépens du saccharose, attaquent de préférence le lévulose pour laisser du dextrose, sont ceux-là mêmes qui, aux dépens de la mannite, nous ont fait de

la mannose, sucre aldéhydique dextrogyre comme ce dextrose ; et de même, le *Bac. subtilis* qui, dans cette expérience sur le sucre de canne, laisse un résidu de lévulose, est celui-là même qui nous a fait de la lévulose en partant de la mannite.

Aussi, notre interprétation relative à l'oxydation de la mannite pourrait-elle être suspectée. Il se pourrait bien que nos microbes, au lieu de faire chacun une seule hexose, mannose ou lévulose, fissent chacun les deux sucres isomériques, dont l'un serait brûlé plus rapidement que l'autre, qui resterait comme résidu.

Il y a plus : envisageant la combustion de la glycérine sous le même jour, nous devons nous poser la question de savoir si la glycérose aldéhydique lévogyre, reconnue dans le cours de ces recherches, serait bien le sucre unique issu de cette oxydation ; ou s'il ne se formerait pas, concurremment à celui-ci, un sucre cétonique isomérique, la dioxycétone.

Comme on le voit, nous sommes irrésistiblement poussés, par la seule observation des faits, vers l'étude d'une des faces de ce problème posé par Pasteur : celui qui est relatif à la formation des corps doués du pouvoir rotatoire, par l'action de la cellule vivante sur les corps inactifs par symétrie moléculaire. Ce sera là l'objet d'une étude spéciale.

Ce qui ressort nettement de cette partie de nos recherches, c'est que les bihexoses et l'amidon sont ramenés sous la forme de sucres simples, aldoses ou cétooses, par l'action des diastases hydratantes ; et que ces sucres sont à leur tour transformés en glycérose.

V

Nous voici arrivés au point culminant et critique de ces recherches. Tous les corps complexes, alcools polyatomiques et hydrates de carbone sont venus se rencontrer ici, et ont tous revêtu la forme plus simple d'un sucre en C^3 . Il s'agit de savoir si les microbes arrêtent ici leur travail de destruction, ou si ce sucre n'entrera pas en réaction, tout comme les sucres dont il dérive.

Sur ce point, nous en sommes encore réduits aux conjectures. Aucune des expériences exposées jusqu'ici ne saurait être

invoquée comme une preuve. Cependant le peu de stabilité de la glycérose vis-à-vis des agents physico-chimiques fait prévoir sa faible résistance vis-à-vis des cellules vivantes.

L'expérimentation pourra facilement nous éclairer : il suffira de suivre, à l'aide du polarimètre, son apparition, son accumulation et sa disparition éventuelle dans les liquides de culture.

Il m'a paru qu'il y aurait intérêt à partir des aldoses, plus rapprochés des corps brûlés que les alcools ou les bihexoses : le *bouillon* qui favorise, comme nous l'avons vu, la combustion des corps ternaires, a été employé comme aliment azoté.

Mais j'ai fait d'abord une première épreuve dans la solution des sels ammoniacaux additionnée de glucose, et j'ai pu constater, non seulement que ce mélange constituait un bon milieu de culture, mais encore que le liquide distillé à diverses époques renfermait de la glycérose.

Tyrophthrix tenuis dans 100 c. c. de solution ammoniacale à 5 0/0 de glucose.

Après 20 jours.....	$\alpha = - 32'$
— 40 —	$\alpha = - 46'$
— 55 —	$\alpha = - 56'$

Le glucose est donc capable d'entrer en réaction de lui-même et pour ainsi dire de pied ferme, sans être entraîné par la réaction qui le produit dans le dédoublement du saccharose. Il est apte à fournir au microbe ses aliments de construction et d'entretien.

Essayons à présent d'évaluer les proportions relatives de glycérose dissoutes dans les liquides distillés aux diverses époques de la culture : ces quantités étant proportionnelles à l'angle de rotation pour une même température, je les indiquerai par la valeur de cet angle.

Tyrophthrix tenuis. Bouillon glucosé à 5 0/0, 100 c. c.

	Sucre restant.	Sucre consommé.	Angle de rotation.
Après 15 jours de culture..	1,247	75,06 0/0	$\alpha = - 42'$
— 30 — ..	0,412	91,76 0/0	$\alpha = - 102'$
— 45 — ..	»	100,00 0/0	$\alpha = - 38'$

L'épreuve est significative à divers titres : les 75 0/0 de glucose consommés pendant la première période ont produit une proportion de glycérose correspondant à un angle de $- 42'$; les 16,70 0/0 de glucose consommés du 15^e au 30^e jour ont

produit la proportion de glycérose relativement beaucoup plus élevée correspondant à un angle de $-20'$; puis, le sucre générateur ayant disparu ou étant devenu plus rare, la glycérose a été elle-même attaquée. Nous voyons ainsi se succéder trois modes de fermentation très différents dans une même culture, notion que les recherches de M. Perdrix ¹ et celles de M. Grimbart ² ont déjà mise en lumière. Mais ce que je veux retenir, c'est que notre sucre à 3 atomes de carbone joue le rôle de produit intérimaire.

Répetons l'expérience avec la glycérine :

Tyrophrix tenuis. — Bouillon glyciné à 5 0/0 : 100 c. c.

Après 15 jours de culture.....	$\alpha = - 1^{\circ}6'$
— 30 —	$\alpha = - 1^{\circ}36'$
— 45 — glycérine restant = 0,058 —	$\alpha = - 2^{\circ}8'$

Ici, la glycérose s'est accumulée *incessamment* dans le liquide de culture, si bien que, considérée isolément, cette expérience pourrait donner à penser que ce sucre est un produit ultime de la vie du microbe; d'autre part, les quantités de glycérose retrouvées après chaque période sont sensiblement plus élevées que celles constatées dans l'expérience précédente.

Ne pourrions-nous expliquer ces différences par les différences qui existent entre la glycérine et le glucose en tant que générateurs de caloriques?

La chaleur de combustion du glucose étant de 673 calories pour un poids moléculaire de 180; celle de la glycérine étant de 392,5 calories pour un poids moléculaire de 92, il s'ensuit que la combustion totale de 5 grammes de glycérine dégagerait 21,3 calories contre 18,7 calories que dégagerait un poids égal de glucose.

Il est facile de concevoir que, par cela même, le microbe ne procède pas aussi rapidement à la combustion intégrale de la glycérine, et qu'il s'arrête plus longtemps sur les termes de passage tels que la glycérose, encore sensiblement endothermiques.

Mais il suffit de l'expérience suivante pour nous convaincre

1. *Ces Annales*, tome V.

2. *Ces Annales*, tome VII.

que la glycérose est aussi bien attaquée dans le cas de la glycérine que dans le cas du glucose.

Bouillon glycérimé 100 c. c. — 2^e passage. — Dans ce liquide, j'ensemence non plus le microbe originel tiré du bouillon, mais le microbe ayant déjà détruit de la glycérine, celui que l'on peut retirer du liquide de l'expérience précédente après 15 jours d'incubation.

Voici les résultats :

Après 15 jours de culture.	Angle de déviation.....	$\alpha = - 1^{\circ} 46'$
— 30	— $\alpha = - 1^{\circ} 24'$
— 45	— $\alpha = - 1^{\circ} 2'$

Du 15^e au 45^e jour, les proportions de glycérose vont en diminuant; ce corps est attaqué par le microbe.

Cette expérience donne à penser que nous pourrions arriver en peu de temps à l'inactivité optique, par une éducation appropriée du microbe.

Pour le vérifier, j'ai fait un deuxième passage sur le bouillon glucosé, en prenant la semence dans le bouillon glucosé du premier passage, après 15 jours de culture :

Bouillon glucosé à 5 0/0 : 100 c. c.; 2^e passage; semence tirée du 1^{er} passage sur glucose après 15 jours d'incubation.

Après 15 jours de culture.....	$\alpha = - 1^{\circ} 4'$
— 30 $\alpha = - 50'$
— 45 Inactivité optique.

Tous les groupements renfermant le carbone asymétrique, même celui qui résiste le mieux et persiste dans la molécule de la glycérose, sont entrés en réaction et ont subi une dislocation intégrale.

Ce point acquis, je me suis demandé si le microbe ne pourrait pas aboutir à la destruction complète du glucose, à la dislocation intégrale de tous les groupements renfermant le carbone asymétrique, sans que nous voyions persister ce groupement plus résistant, et sans que nous puissions retrouver de la glycérose dans le liquide distillé.

J'ai donc pratiqué une série de passages dans le bouillon glucosé; mais, afin de rendre plus saisissants les résultats que l'on peut espérer, j'ai expérimenté sur un volume plus considérable de liquide et forcé la proportion de glucose.

3^e *passage*. — 200 c. c. de bouillon glucosé à 10 0/0.

Semence provenant du 2^e passage après 15 jours d'incubation :

Après 15 jours de culture : $\alpha = - 22'$; sucre consommé : 13gr,94

4^e *passage*. — Liquide de culture identique au précédent.
La semence vient du 3^e passage après 12 jours d'incubation :

Après 10 jours de culture..... $\alpha = - 8'$

— 20 — $\alpha = - 22'$; sucre restant: traces

Il a été détruit, comme on voit, 20 grammes de glucose pour des quantités très minimes de glycérose retrouvées.

5^e *passage*. — Même liquide de culture. La semence est tirée du 4^e passage après 10 jours d'incubation ; mais, cette fois, l'expérience se fait à 38°-39° :

Après 8 jours de culture..... $\alpha = - 0$

— 15 — $\alpha = - 0$

— 20 — $\alpha = - 0$ sucre restant : 0

Tout le glucose a été détruit sans que nous puissions retrouver les moindres proportions de glycérose.

Faudrait-il donc croire que ce sucre ne se forme plus, que quelque rouage du mécanisme de la combustion a été changé ? Nullement ; car si, parallèlement à cette expérience à 38-39°, nous faisons une autre expérience à 23-24° dans des conditions par ailleurs absolument identiques, nous retrouvons dans le liquide de ce 5^e passage des proportions relativement élevées de glycérose pour des proportions relativement faibles de glucose détruites.

Rien d'essentiel n'a été changé dans le processus nutritif des microbes ; mais les phénomènes chimiques qui en sont l'expression se précipitent avec une rapidité telle qu'il nous est impossible de les enregistrer, sinon dans leur résultat final : les termes intermédiaires passent inaperçus. La glycérose s'est donc formée, mais elle a été détruite dès sa naissance dans l'intérieur même du protoplasma.

VI

Les notions qui précèdent demandent une sanction. Que devient la glycérose? Est-elle directement et intégralement brûlée, ou sa combustion se fait-elle en plusieurs fois?

On pourrait bien comprendre que la combustion fût directe, ce sucre ne représentant plus, en somme, un édifice bien élevé ni bien complexe. Cependant des considérations de l'ordre biologique et de l'ordre chimique font pressentir qu'un nouveau corps intermédiaire pourrait encore apparaître entre la glycérose et les corps brûlés. Nous savons, en effet, que si les mucédinées font à titre intérimaire de l'acide oxalique, dans la combustion des corps ternaires complexes, cet acide oxalique se produit encore, au même titre, dans la combustion des corps ternaires relativement simples, tels que l'alcool et l'acide acétique¹, construits, comme l'acide oxalique même, sur deux atomes de carbone. De plus, nos recherches sur les propriétés de la glycérose ont mis en évidence ce fait que les agents physico-chimiques d'oxydation, tels que l'oxyde d'argent, les alcalis, la lumière solaire, laissent tous un résidu, acide acétique, acide formique, ou corps aldéhydique à fonction simple, par leur action sur la glycérose.

Mais une observation très simple nous met immédiatement sur la voie : si, dans les expériences que je viens de relater au sujet de l'accumulation et de la disparition ultérieure de la glycérose, nous étudions le liquide distillé au double point de vue de l'angle de rotation qu'il provoque et de son action sur la solution sulfureuse de fuchsine, voici ce que nous remarquons : tant que s'accroît l'angle de rotation et même lorsqu'il commence à décroître, la solution de fuchsine n'est pas colorée, mais elle prend *parfois* une coloration rouge plus ou moins accusée, dès que le liquide distillé est inactif ou voisin de l'inactivité optique. Cette coloration est l'indice de la présence, dans nos liquides de culture, de traces d'un aldéhyde à fonction simple, dont l'apparition est postérieure à la destruction complète du glucose et coïncide avec la disparition des dernières parties de glycérose ; de telle

1. DUGLAUX, Nutrition intra-cellulaire, dans ces *Annales*.

sorte que nous pouvons reconnaître avec justice des relations de cause à effet, entre ces deux phénomènes simultanés.

Il s'agit de déterminer cette aldéhyde ; mais ici, nous ne heurtons pas l'obstacle qui nous a empêché de déterminer l'aldéhyde formée par l'insolation de la glycérose en solution neutre, puisqu'il nous est toujours possible d'arriver à l'inactivité optique.

Je suis donc parti de 160 grammes de glucose pur et anhydre, dissous dans 2 litres de bouillon de viande. Le liquide étant distribué entre 10 matras, j'aiensemencé le *Tyrophthrix tenuis* et tenu les cultures pendant 60 jours à l'étuve. L'étude de l'un des ballons m'ayant montré qu'il ne restait plus de glycérose et qu'une aldéhyde simple avait pris naissance, j'ai distillé séparément le liquide contenu dans les autres ballons, préalablement additionné de traces d'acide tartrique. Après examen, j'ai réuni tous ces liquides qui étaient inactifs, neutralisé par le carbonate de chaux et distillé une seconde fois. Le produit est additionné de bichromate de potasse et d'acide sulfurique en solutions diluées : une troisième distillation, poussée presque à sec, nous fournit l'acide correspondant à l'aldéhyde. Après neutralisation exacte par la chaux, j'évapore à sec. Il reste 23 milligrammes d'un sel de chaux qui réduit la liqueur cupro-sodique, ce qui correspond à 9 milligrammes d'aldéhyde formique.

Voilà donc tout ce que j'ai pu retrouver, sous la forme aldéhydique, des 160 grammes de sucre aldéhydique mis en fermentation. Mais, si peu que cela soit, cela néanmoins suffit pour nous faire repousser l'hypothèse de la combustion intégrale et d'emblée de la glycérose.

La quantité si minime d'aldéhyde formique retrouvée dans cette expérience est peut-être la quantité maxima qu'il soit possible de retrouver. Il arrive souvent que la solution sulfurée de fuchsine ne révèle aucune trace d'aldéhyde dans des cultures d'où ont entièrement disparu le glucose et la glycérose ; il m'a paru que l'aldéhyde formique se rencontrait plus souvent dans les vieilles cultures où l'attaque de la glycérose et sa disparition étaient relativement lentes, et qu'on n'en trouvait pas le plus souvent dans les cultures où la glycérose n'apparaissait qu'en petite quantité, telles que celles des 2^e et 3^e passages. Dès lors,

se présente la question de savoir si l'aldéhyde formique ne se formerait que pour être détruit, sitôt formé, tout comme la glycérose elle-même, et comme les hexoses issues de l'oxydation de la mannite.

Je sais bien qu'une telle manière de voir ne saurait s'imposer. Ceux des biologistes qui s'exagèrent peut-être l'antagonisme existant, au moins en apparence, entre les deux notions de *valeur alimentaire* et de *pouvoir antiseptique*, souvent rappelées en biologie, n'attribueraient pas volontiers à l'aldéhyde formique la propriété d'entrer dans le processus nutritif des microbes.

Il existe cependant un précédent qui, s'il ne peut être invoqué dans ce cas particulier comme une preuve décisive, mérite d'être rappelé parce qu'il plaide chaudement ma thèse : je veux parler de l'expérience par laquelle M. Duclaux a démontré¹ que l'acide formique, dont le pouvoir antiseptique n'est pas douteux, et qui, par ailleurs, serait de valeur alimentaire nulle pour de nombreux microbes, attendu que sa constitution chimique le rapproche des corps brûlés, est néanmoins susceptible de nourrir les microorganismes aérobies, grâce à l'intervention de l'oxygène de l'air.

J'exposerai donc, avec quelques détails, l'expérience fort simple que j'ai entreprise, bien qu'elle soit calquée sur l'expérience dont je viens de parler, parce que, à mes yeux, ces résultats ne laissent subsister aucun doute.

J'ensemence le *Tyrophrix tenuis* dans une série de ballons renfermant chacun 100 c. c. de bouillon de viande. Après 4 jours de culture, un beau voile de microbes s'étant formé dans tous ces ballons, j'injecte dans ces masses de liquide, au-dessous des voiles, les quantités respectives de 2, 5, 15 et 20 milligrammes d'aldéhyde formique. Ce sont là des doses puissamment antiseptiques, surtout les trois dernières; ce sont aussi des doses, même les plus faibles, qui, à cet état de dilution, impressionnent nettement, comme je m'en suis assuré, la solution de fuchsine sulfureuse.

L'effet du toxique ne se fait pas longtemps attendre. Dans tous ces ballons, les voiles de microbes, après quelques instants,

1. Ces *Annales*, tome VI : Sur l'action antiseptique de l'acide formique.

se disloquent, se détachent des parois et tombent au fond du vase. Puis, peu à peu, les microbes qui troublaient légèrement la masse des liquides se déposent en un sédiment; si bien qu'après 48 heures, nous pourrions croire, faisant abstraction du dépôt de cadavres, que ces liquides viennent d'être filtrés à la porcelaine. Il semble que toute vie soit éteinte; mais ce n'est que l'apparence. Après un certain temps, variable suivant les proportions d'aldéhyde formique introduites, de nouveaux voiles de microbes reparaissent dans ces ballons : après 5 jours, 14 jours, 27 jours, dans les liquides qui avaient respectivement reçu 2, 5 et 10 milligrammes de formaldéhyde. Quant aux autres, ils sont restés limpides.

Quelques microbes, dans le nombre, n'ayant pas immédiatement succombé, se sont peu à peu accoutumés au milieu toxique, ont fait souche d'individus qui ont hérité de la résistance acquise par leurs ascendants, si bien que rien ne distingue le voile qu'ils forment sur ce liquide primitivement empoisonné, du voile primitif que le toxique avait abattu.

L'aldéhyde formique jouerait-elle à l'égard de ces microbes le rôle d'un corps inerte? Si nous distillons, après les avoir additionnés de traces d'acide tartrique, ces liquides de culture 20 jours après la formation du 2^e voile, il n'en est pas un, même celui qui avait reçu 10 milligrammes d'aldéhyde formique, qui impressionne à un degré quelconque la solution sulfureuse de fuchsine. Toute l'aldéhyde formique a disparu ¹. A plus forte raison, pourrions-nous admettre que dans les cultures sur le bouillon-glucose qui en sont exemptes, même après que le glucose et la glycérose ont été détruits, cette aldéhyde a pu être détruite au moment même de sa formation dans l'intérieur du protoplasma cellulaire. Et comme je n'ai pu retrouver aucune trace d'acide formique dans ces cultures d'où l'aldéhyde a disparu, l'interprétation presque forcée, c'est que cette aldéhyde a été brûlée, par une réaction inverse de celle qui lui donne naissance dans les feuilles vertes.

Nous avons donc nettement aperçu les divers stades de com-

1. J'ai tenu à l'étuve, pendant deux mois, des ballons renfermant 100 c. c. de bouillon additionnés de 5 milligrammes d'aldéhyde formique. Ces ballons bouchés au tampon de coton, examinés après ce temps, n'avaient pas perdu leur aldéhyde.

bustion, depuis la mannite et l'amidon jusqu'à l'anhydride carbonique et l'eau, en passant par des formes aldéhydiques de plus en plus simples.

Tout le glucose générateur a-t-il subi la combustion complète ? Quelques molécules n'auraient-elles pu échapper à cette destruction, ou n'auraient-elles pu suivre une autre voie ?

Je rappellerai que les liquides de culture soumis à une première distillation fournissent un produit acide. Il se forme donc des acides gras aux dépens des corps ternaires ; peut-être s'en forme-t-il aussi qui appartiennent à une autre série. Je reviendrai sur ce point dans un prochain mémoire.

Nous voyons en résumé, que nos microbes revêtent une physionomie extrêmement originale, dont j'ai cherché à marquer les traits les plus saillants, par l'étude des corps intermédiaires qu'ils forment dans leur combustion des corps ternaires.

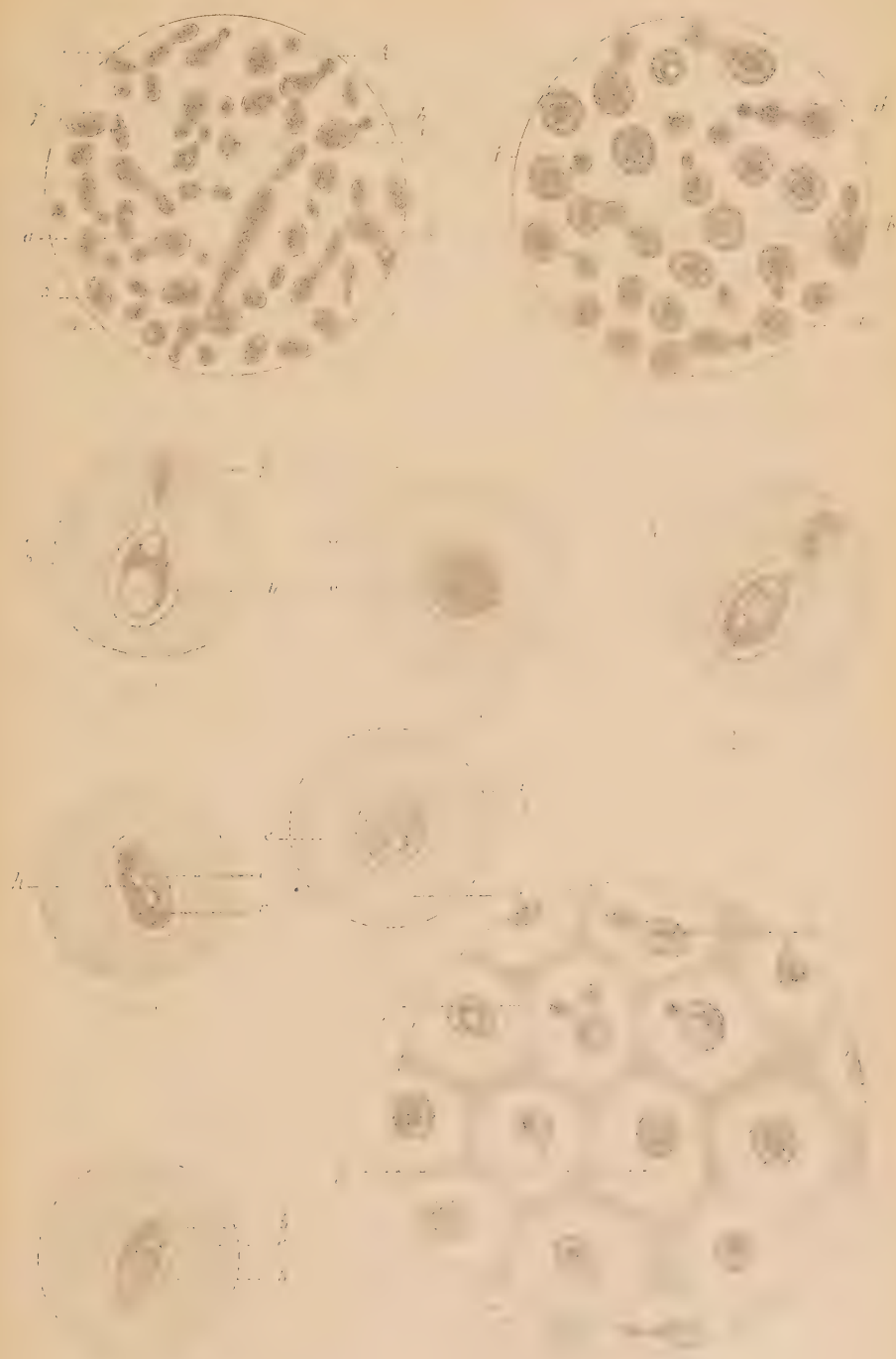
Sans doute, il nous est parfois très difficile de saisir au passage ces corps intermédiaires dont la tendance est d'entrer en réaction, et de disparaître à mesure qu'ils se forment : il a suffi de substituer le bouillon à la solution des sels ammoniacaux pour que nous ne retrouvions plus les hexoses qui dérivent de la mannite ; quelques passages dans le bouillon glucosé, une différence de 3 ou 4 degrés dans la température de culture ont permis au microbe de brûler son aliment ternaire, sans que la glycérose fût extravasée de la cellule dans le liquide de culture ; quant à l'aldéhyde formique, rien ne nous semble plus difficile à préciser que les conditions qui favorisent ou empêchent son apparition : tellement subtiles et puissantes sont les causes qui gouvernent les relations de la cellule vivante avec le milieu extérieur.

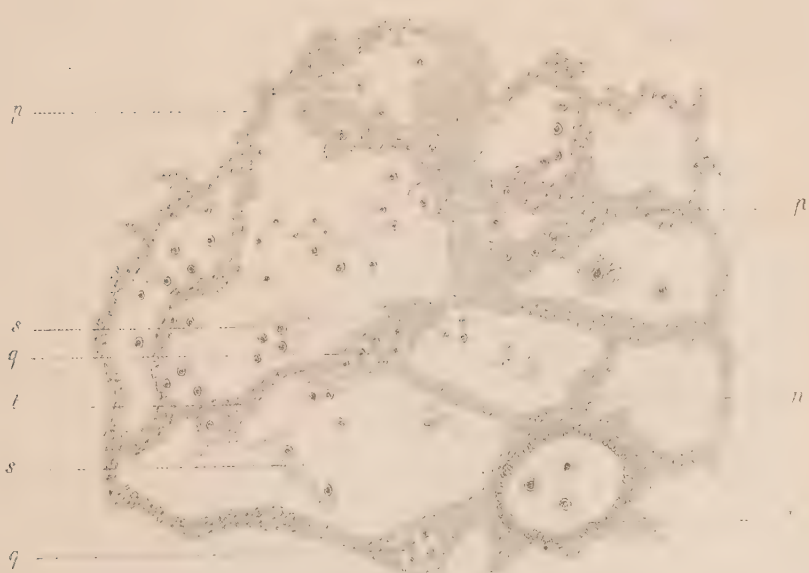
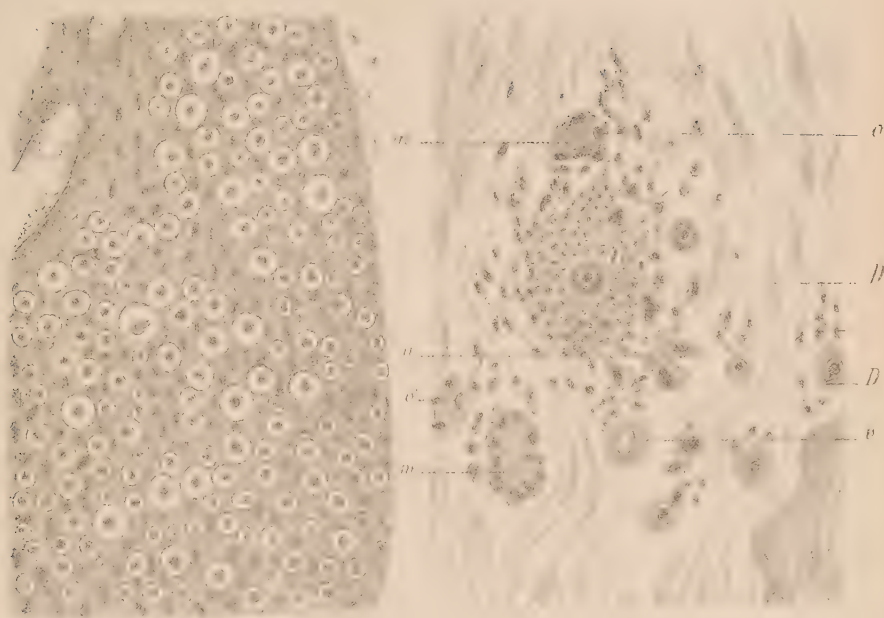
L'étude biologique de ces microbes nous a permis d'apercevoir, dans son ensemble, le mécanisme de la combustion des corps ternaires. Mais combien nombreux sont encore les points laissés dans l'ombre, et non des moins essentiels : les alcools polyatomiques sont transformés en aldoses ou cétooses par oxydation ménagée, voilà qui est acquis ; mais nous ne pourrions dire si chaque microbe fait un seul sucre, ou deux sucres isomériques obéissant avec une vitesse inégale à l'action destructive du microbe. Les hexoses sont transformées en une triose, je crois

bien l'avoir démontré; mais le dédoublement qui semble exprimer cette réaction, est-il apparent ou réel? et s'il est réel, engendrerait-il deux molécules identiques ou deux molécules isomériques en C^3 , dont l'une serait détruite plus facilement que l'autre, et celle-ci plus stable peut-être uniquement à cause même de sa forme stéréochimique?

Ce sont là des questions qu'il importerait de résoudre, et qui, même à distance, paraissent éminemment délicates.

Mais il faut prendre son parti de ces deux difficultés, puisque, de quelque côté que nous entreprenions les microbes, par quelque porte que nous essayions de pénétrer dans l'intimité de leur vie, il surgit devant nous, un premier pas franchi, quelque nouveau problème toujours plus ardu et plus complexe, mais toujours aussi plus attachant.





CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA SACCHAROMYCOSE HUMAINE

PAR F. CURTIS

Professeur d'anatomie pathologique et de pathologie générale à la Faculté de médecine de Lille.

L'étude des blastomycètes parasites chez l'homme, de date encore récente, s'est trouvée dans ces derniers temps enrichie d'une série de faits nouveaux ; c'est pourquoi il nous a semblé utile de faire connaître les expériences que nous avons poursuivies depuis plus de six mois avec une levure trouvée par nous dans le tissu cellulaire de l'homme. Nous remercions M. le professeur Metchnikoff, qui a bien voulu nous donner son opinion sur la question si controversée du noyau des levures, et compléter nos documents bibliographiques par l'analyse de quelques travaux publiés en langue russe.

Sans faire ici d'historique, nous croyons devoir rappeler les principaux travaux publiés sur cette question encore obscure de pathologie générale.

Nous renvoyons aux traités généraux pour tout ce qui concerne les premières découvertes de blastomycètes dans les produits pathologiques, suppurations ou excréta des malades ; la plupart de ces observations se bornent à la constatation d'un fait sans démonstration expérimentale. Une des premières relations bien établies de levure pathogène chez l'homme a été donnée par Achalmé et Troisier (1) dans un cas d'angine parasitaire ressemblant cliniquement à du muguet. Dans ce cas, l'agent d'infection était un organisme que la culture en milieux artificiels a permis de classer parmi les saccharomycètes.

Busse (2), il y a un an, a réussi à isoler, dans un abcès du tibia, un microorganisme qui, à l'examen microscopique comme à la culture, présentait tous les caractères d'une levure véritable.

La malade de Busse était une femme de 35 ans, qui mourut d'ailleurs après avoir présenté des abcès osseux du cubitus et des côtes. Elle fut enlevée par une véritable infection générale, une

pyémie produite par l'envahissement de tous les organes par le microorganisme. Celui-ci fut retrouvé à l'autopsie dans les reins, la rate et les poumons. Des cultures pures et des inoculations démontrèrent que cette levure était pathogène pour les souris blanches, chez lesquelles elle produit une véritable infection identique à celle observée chez l'être humain.

Nous avons fait connaître nous-mêmes (3) au mois d'août 1895 un microorganisme analogue à celui de Busse, mais qui cependant en diffère par plusieurs caractères. La question de cette non-identité sera discutée plus loin.

D'autres observateurs ont pu déceler des levures pathogènes chez les animaux, ou produire à l'aide de levures vulgaires des infections générales.

C'est ainsi que le professeur San-Felice (4) a isolé dans le jus de fruits fermentés une variété de blastomycètes auxquels il donne le nom de *Saccharomyces neoformans*. Ce parasite injecté aux cochons d'Inde les tue dans l'espace de 30 jours. Lorsque l'injection a été faite dans le tissu cellulaire, il se développe au point d'inoculation une tumeur molle renfermant en masse le parasite. Des embolies parasitaires se trouvent dans la rate, dans le foie.

Depuis, le même auteur a rencontré dans les ganglions tuméfiés d'un bœuf, mort de carcinose primitive du foie, un microorganisme de même nature, auquel il donne le nom de *Saccharomyces litogenes*. Ce champignon, en effet, cultivé et inoculé aux animaux, produit des tumeurs sous-cutanées dans lesquelles se forment des concrétions calcaires.

Les cochons d'Inde, inoculés sous la peau, meurent au bout de deux mois; inoculés dans le péritoine, après 30 jours. A l'autopsie on trouve des embolies multiples dans les poumons, les ganglions mésentériques, la rate.

Le mouton est également réceptif. Il se produit chez cet animal des abcès sous-cutanés.

Maffucci et Sirleo (5) ont trouvé chez un cobaye cachectique une tumeur fluctuante du sommet du poumon gauche. Cette collection purulente renfermait un microorganisme que les cultures permirent d'isoler; c'était une levure produisant chez les animaux inoculés des abcès et du gonflement ganglionnaire.

Enfin, récemment, Lydia Rabinowitch (6), sur une cinquantaine d'espèces de levures vulgaires, en trouva sept qui étaient patho-

gènes pour les animaux. Aucune de ces levures n'a d'action sur le cochon d'Inde ; elles agissent, au contraire, sur les souris et quelques-unes sur le lapin. Les animaux inoculés meurent par infection et non par intoxication.

PROVENANCE DU MICROORGANISME

Le parasite dont nous faisons ici l'étude a été trouvé par nous dans les conditions suivantes.

Le 15 juillet 1895, M. le professeur Folet nous remettait les fragments d'une tumeur d'apparence myxomateuse, enlevée le jour même à l'un de ses malades de l'hôpital Saint-Sauveur.

Le néoplasme siégeait à la région supérieure de la cuisse droite, au niveau de la base du triangle de Scarpa, et présentait le volume de deux poings. Il existait de plus chez ce même individu, et également du côté droit, un abcès volumineux de la région lombaire; abcès d'ailleurs ulcéré laissant écouler une petite quantité de pus épais et floconneux. La peau était saine, au contraire, et absolument intacte au niveau de la tumeur crurale qui, par sa consistance molle et demi-fluctuante, avait fait porter le diagnostic d'abcès par congestion.

L'incision montra qu'il s'agissait simplement d'une poche sous-cutanée renfermant un tissu mou et comme gélatineux. Il semblait en un mot que l'on eût sous les yeux quelque sarcome ayant subi une transformation muqueuse très avancée.

La tumeur de la cuisse ainsi que celle de la région lombaire furent enlevées en totalité, et leur enveloppe décortiquée par la dissection; on put voir alors que la lésion siégeait dans le tissu cellulaire, entre peau et muscles, sans aucune trace d'envahissement profond.

Le malade d'ailleurs est un homme jeune, d'aspect bien portant, et ne présentant aucune tare individuelle ni héréditaire. Les poumons sont sains, ainsi que les autres organes thoraciques et abdominaux. Aucune étiologie spéciale ne peut être invoquée dans le genre de vie du malade, qui est ouvrier serrurier depuis l'âge de douze ans. Il est à noter cependant que la tumeur lombaire et crurale ont apparu à la suite d'une période de vingt-huit jours faite en mai, au 15^{me} d'artillerie.

Nous ajouterons ici que ce malade est mort récemment.

enlevé par des accidents méningitiques, de nature mal déterminée. Cette fin brusque, survenue plus de dix mois après une opération bénigne suivie d'une guérison complète, nous laisse malheureusement dans l'incertitude la plus grande. Le malade étant mort en ville, aucune étude n'a été possible et nous ignorons s'il y a relation de cause à effet ou simple coïncidence fortuite entre l'existence du néoplasme parasitaire et l'apparition des accidents méningitiques ultimes.

Nous renvoyons à nos publications antérieures pour tout ce qui a trait au premier examen de la tumeur et à l'isolement du microorganisme pathogène.

ÉTUDE DU PARASITE. — TECHNIQUE

L'examen direct des cellules fraîches dans l'eau ou dans un liquide légèrement fixateur, tel que le liquide de Pictet, est une des meilleures méthodes.

Pour la coloration sur lamelle, nous avons adopté le procédé suivant :

1° Fixer la culture sur lamelle par dessiccation lente et par l'action de la solution d'alcool et d'éther ;

2° Colorer 10 minutes avec la solution suivante :

Violet de méthyle 6B Sol. sat. alcool abs.....	4 gr.
Solution de potasse à 1/10000.....	9 —

3° Laver une minute avec l'acide pyrogallique en solution aqueuse à 1/100. Cette substance solubilise le violet et le fixe légèrement sur la partie centrale de la cellule ;

4° Laver 15 secondes à l'alcool, passer à l'eau, et monter dans un liquide sucré tel que le liquide de Brun.

La paroi de la cellule se colore ainsi en violet rose, le centre en violet foncé.

La thionine en solution phéniquée, de Nicolle, donne aussi de bons résultats. On monte dans le liquide suivant :

Eau.....	400
Glycose.....	30
Glycérine.....	7
Thionine phéniquée.....	7

Les préparations sont persistantes.

Pour les coupes, le picro-carmin employé comme fixateur et colorant, suivi du montage dans la glycérine formiquée à 1 0/0, donne de bons résultats. On colore ainsi les grains de chromatine contenus dans la cellule.

On peut également obtenir des préparations à double coloration en employant le carmin de Orth, suivi du violet de méthyle 6B en solution potassique. On décolore par l'acide pyrogallique à 1 0/0 et on monte dans le baume. Le microorganisme reste coloré par le Gram.

MORPHOLOGIE DU PARASITE

Le parasite se présente sous deux formes absolument distinctes, la forme nue (fig. I A, Pl. IV) et la forme encapsulée (fig. IV D) suivant qu'on l'examine en culture ou dans les tissus vivants.

Busse et San-Felice avaient aussi trouvé ce double aspect dans leurs levures pathogènes. Nous verrons toutefois dans la suite de ce travail que la forme encapsulée n'est pas exclusivement propre à l'état parasitaire. Nous l'avons, en effet, retrouvée en culture artificielle; ce que MM. Busse ou San-Felice ne paraissent pas avoir obtenu.

Forme nue. Nous prendrons, comme type de la forme nue, celle qu'on rencontre dans les cultures sur gélose après 48 heures de séjour à l'étuve. C'est une petite cellule ronde ou ovoïde mesurant environ de 3 μ à 6 μ de diamètre, pourvue d'une membrane d'enveloppe, nette, limitée par un double contour et renfermant d'ordinaire un ou deux petits grains très réfringents. Sur une culture jeune, les cellules ovoïdes sont beaucoup plus nombreuses que les sphériques, et presque toutes portent à l'une de leurs extrémités un petit bourgeon (fig. I f). Colorées avec le violet de méthyle, les cellules prennent une teinte violet rouge au niveau de leur paroi propre (*a*) et violet foncé dans leur centre. Il existe toujours des espaces clairs (*d*), des grains réfringents (*c*) qui ne prennent pas la coloration.

Les réactifs cytologiques permettent de mieux différencier ces divers détails.

Le vert de méthyle acétique, après une heure de contact, colore au centre de chaque cellule des traînées irrégulières à contours flous, de teinte vert pâle, sur lesquelles se détachent une infinité de petits grains très nets et très colorés.

Les dissolvants nucléaires faibles font gonfler ces grains sans les dissoudre. Avec la potasse à 50/0, l'eau de chaux concentrée ou l'acide chlorhydrique fumant, la plupart des cellules perdent leur aspect granuleux, et lorsque après lavage à l'eau on les recolore au vert de méthyle, elles prennent une teinte diffuse, comme si les grains colorés s'étaient dissous dans le protoplasme. Il s'agit donc bien ici de grains de chromatine tenus en suspension dans le protoplasme cellulaire. Les éléments jeunes et en particulier les bourgeons en sont bourrés, les cellules les plus grosses en sont pauvres; quelques-unes même sont absolument vides de contenu granuleux et restent incolores avec tous les réactifs. Ce sont là sans doute des formes en involution qui existent toujours en plus ou moins grand nombre dans les préparations (V).

Quant aux gros grains réfringents (c) contenus dans presque chaque cellule, ils ne se gonflent dans aucun des dissolvants nucléaires. Ils résistent à la potasse à 50/0 et à l'acide chlorhydrique fumant. Ils brunissent légèrement dans l'acide osmique, mais ne se dissolvent pas dans l'éther ni dans la benzine, même après 24 heures de contact. Nous sommes porté à les considérer comme des matières albuminoïdes de réserve accumulées dans le protoplasme cellulaire. Le pléomorphisme de notre levure est en somme peu étendu. La levure augmente de taille dans les milieux sucrés acides, et prend souvent alors la forme en chaînette de 3 ou 4 articles (fig. II B). C'est surtout lorsqu'elle pousse à basse température que ces formes articulées deviennent abondantes. Dans un vieux liquide peptonisé et sucré acide, ayant plus d'un mois d'étuve à 39°, on voyait à côté d'individus en chaînette de grosses cellules encapsulées rappelant absolument celles de l'état parasitaire, fig. III, mais de taille plus petite. Certaines de ces cellules portaient 2 bourgeons issus du même pôle.

La multiplication de la levure se fait toujours par bourgeonnement. Il se produit parfois dans les cultures sur gélose des formes de multiplications anormales (fig. I x).

Forme encapsulée (fig. IV, 1 à 6). La forme encapsulée se distingue de la précédente par ses dimensions beaucoup plus considérables.

Dans les tissus de l'homme ou des animaux inoculés, le parasite prend généralement l'aspect d'une grosse sphère de 16 à 20 μ de diamètre, pourvue d'une paroi propre bien distincte (*a*) d'environ 0,5 μ et revêtue d'une épaisse couche de substance gélifiée (*g*) qui forme autour de lui comme une auréole transparente.

La capsule hyaline atteint 8 à 10 μ d'épaisseur, de sorte que le microorganisme muni de toutes ses enveloppes mesure environ 40 μ de diamètre. On trouve également dans les tissus des formes ovoïdes et d'autres bourgeonnantes.

Le bourgeon naissant et la cellule mère sont alors contenus dans la même enveloppe gélifiée qui s'étrangle légèrement au point de germination.

La constitution de la capsule gélifiée (*g*) est difficile à déterminer. Elle gonfle démesurément au contact des alcalis, mais sans se dissoudre. Elle finit cependant par être corrodée et détruite par un séjour de 24 heures dans la potasse à 40 0/0.

Elle résiste d'autre part aux acides forts qui la rétractent simplement. L'alcool produit le même effet. L'enveloppe gélifiée se colore d'ailleurs très difficilement; il faut employer les solutions très puissantes, telles que la fuchsine de Ziehl, pour lui donner une légère teinte qu'il est d'ailleurs difficile de fixer. Dans les tissus humains, la capsule hyaline laisse voir par places à son intérieur une série de cercles concentriques qui répondent évidemment à des zones d'accroissement.

La paroi propre (*a*) de la cellule n'offre que peu d'intérêt. Elle est en général d'autant plus épaisse que la cellule est plus grosse, et manque sur les petits bourgeons. Elle se colore à l'état frais en violet lie de vin par le chloro-iodure de zinc, réaction de la cellulose. Quant au contenu de la cellule de levure, il ressemble à celui de la cellule nue en culture.

Les grains de chromatine remplissent totalement les jeunes bourgeons. Ils se disposent de manière variable dans la cellule mère, tantôt accumulés à l'un des pôles, tantôt refoulés sur l'un des bords formant une zone granuleuse en croissant (Fig. IV, 1 à 6). Parfois ils entourent en forme de couronne une grosse sphère réfringente ou un espace clair central. Ils remplis-

sent en totalité un grand nombre d'éléments (fig. IV, 2).

Ces grains sont certainement en suspension dans le cytoplasme; car, en se servant des colorants protoplasmiques tels que l'éosine ou la fuchsine acide, on peut voir se colorer en rouge les zones dans lesquelles le vert de méthyle décelait des granulations. On peut même, en combinant les deux colorations, mettre en évidence les grains de chromatine qui se détachent alors en vert sur le fond rouge du protoplasme. Il existe une relation certaine entre l'activité fonctionnelle de la cellule et l'abondance plus ou moins grande des grains de chromatine.

CARACTÈRES DE CULTURE

Ce parasite se comporte en général à la façon des levures et préfère les milieux acides ou neutres.

En stries sur gélose faiblement alcaline, le microbe se développe assez lentement à 37°. Lorsque la semence provient d'un tissu vivant, c'est après 48 heures seulement et quelquefois même après trois jours que l'on voit paraître des petites colonies punctiformes, blanches dès le début et opaques, qui se fusionnent à la longue, mais jamais jusqu'à former une strie absolument uniforme. Il en est autrement si l'on réensemence une vieille culture. Dans ce cas, la culture se fait dès le lendemain et paraît sous forme d'une strie blanche transparente qui cependant n'envahit jamais toute la surface. Elle devient épaisse et crémeuse au bout de 8 jours. Après 6 mois elle est encore réensemencable.

Sur gélatine en piqure, le microbe pousse à la température ambiante en 48 heures. Il se développe en une traînée blanche discontinue qui s'égrène dans le fond du tube en petites colonies punctiformes, et s'élargit légèrement vers la surface.

Sur gélatine inclinée, la culture est plus rapide à cause du contact de l'oxygène. Il se fait en 4 à 5 jours une strie blanche crémeuse et saillante, mais qui n'a pas de tendance à envahir, et reste stationnaire au bout d'une semaine.

Jamais la gélatine n'est liquéfiée.

Ensemencé en bouillon ordinaire, le microbe pousse, mais imparfaitement. Il se forme en 2 à 3 jours un dépôt floconneux qui ne s'accroît plus dans la suite. Le bouillon reste clair. °

Sur pomme de terre glycéinée, la culture est rapide et donne

un enduit blanc et crémeux qui met un certain temps, 4 à 6 jours, avant de s'étendre, mais finit par couvrir toute la tranche ensemencée et coule en dernier lieu dans le fond du tube.

Sur pomme de terre ordinaire à l'étuve, il se développe en 48 heures une strie blanche, continue et en général sèche. Elle s'épaissit peu à peu et brunit au bout de 15 jours à 3 semaines, surtout si le tube n'est pas coiffé d'un capuchon de caoutchouc.

Le microorganisme est avide d'oxygène, mais n'est cependant pas tué par l'absence de ce gaz. L'expérience suivante le démontre. Après avoir ensemencé un tube à pomme de terre muni d'une tubulure latérale, nous y faisons le vide et le scellons à la lampe. Mis à l'étuve à 37°, ce tube reste stérile pendant 8 jours. Cassant alors ce tube latéral, nous laissons rentrer l'air et, dès le lendemain, nous observons une culture assez abondante. Les limites de température entre lesquelles la levure se développe sont comprises entre 15° et 39°.

Le micro-organisme ne se développe pas sur sérum sanguin.

Sur moût de bière gélosé à 37° en tubes inclinés, le parasite forme rapidement une strie blanche, continue et saillante, sans cependant envahir jamais en totalité la surface. Au contact de l'air, ces cultures brunissent au bout de 10 à 15 jours comme celles sur pomme de terre.

Les liquides acides donnent également des cultures bien meilleures que le bouillon ordinaire.

Une solution de peptone contenant 10 grammes de peptone, 5 grammes de sel et l'équivalent, en acide tartrique ou chlorhydrique, de 0,3 ou 0,5 d'acide sulfurique par litre, constitue un bon milieu de culture. Pour des acidités supérieures, la culture ne se fait presque plus ; il en est de même quand la solution de peptones est exactement neutre. Il n'y a aucune culture quand la solution est légèrement alcaline, alors que cependant le micro-organisme pousse en bouillon ordinaire alcalin.

Le touraillon acide et le moût de bière, ce dernier surtout, donnent les cultures les plus abondantes, et qu'on peut peser au bout de 10 à 15 jours, si l'on a soin d'ensemencer en larges vases coniques.

Jamais dans tous ces liquides acides il ne se fait de développement en membrane ou en pellicules superficielles, comme cela arrive avec le parasite décrit par Busse.

Pouvoir inversif. — Pour étudier l'inversion du saccharose, nous avons mélangé, à la solution de peptone indiquée plus haut, une solution de saccharose, de façon à ce qu'il y ait de 8 à 12 0 0 de ce sucre. Les 2 solutions étaient stérilisées d'avance et mélangées aseptiquement au moment de l'ensemencement. Des flacons non ensemencés restaient comme témoins et conservaient leur titre au polarimètre. Pendant ce temps, on voyait dans les ballons ensemencés la déviation décroître, devenir gauche, et le sucre interverti apparaître à la liqueur de Fehling.

Voici une expérience précise où le dosage du sucre a été fait en tenant compte de l'évaporation.

Un vase d'Erlenmeyer renferme au début 1 gr. 780 de sucre en milieu acide. Après 46 jours d'étuve à 37°, on constate qu'il y a 1 gr. 641 de sucre interverti, 0 gr. 06 ont disparu et 0 gr. 079 restent encore dans le milieu de culture.

Les flacons témoins montrent que ce séjour à l'étuve n'a nullement altéré le sucre en solution acide.

En milieu peptoné neutre, l'inversion est plus lente.

Pouvoir fermentatif. — Nos expériences sur ce sujet ont été faites comme les précédentes à 37°, température peut-être un peu trop élevée pour notre levure, et eussent sans doute donné des résultats différents à plus basse température : c'est pourquoi nous n'en donnerons qu'un bref résumé :

1° Une solution de peptone composée comme ci-dessus, et contenant 3 0/0 de saccharose, nous a donné après 35 jours à 37°, un liquide qui, ramené par distillation à 10 c. c., donnait 103 gouttes au compte-gouttes, et présentait la réaction de l'iodoforme : il y avait en outre 0 gr. 133 d'acide acétique ;

2° 500 grammes de moût de bière, après 40 jours à 37°, ont fourni 309 milligrammes de levure et environ 0 c. c. 1 d'alcool éthylique ;

3° Dans une solution de peptone sucrée et acide, après 35 jours d'étuve à 37°, nous avons trouvé de l'acide acétique par la méthode des distillations fractionnées de M. Duclaux, et le liquide de distillation, saturé par la soude et évaporé, donne un résidu qui fournit d'une manière évidente la réaction du cacodyle ;

4° Un moût de bière ensemencé et laissé 40 jours à 37° a donné 0 gr. 078 d'acide acétique, tandis qu'il n'y avait

que 0 gr. 021 dans du moût identique non ensemencé.

La levure en question produit donc aux dépens du sucre, comme aux dépens du moût, de l'alcool éthylique et de l'acide acétique ; mais ce n'est pas une levure alcoolique active.

Quant à l'action de la levure sur les différentes variétés de sucre, nous pouvons dire qu'elle n'agit réellement en solution de peptone que sur le saccharose.

La levure se développe mal dans des solutions de peptone additionnées de maltose, de glycose et de lactose : avec l'eau de levure, les résultats sont meilleurs mais encore très médiocres, c'est le saccharose qui semble le sucre préféré.

INOCULATION

L'inoculation de la levure aux divers animaux nous a montré que son pouvoir pathogène est en somme assez limité. Les animaux employés ont été le chien, le lapin, le cochon d'Inde, le rat et la souris.

Le cobaye est presque absolument réfractaire aux inoculations qui passent presque inaperçues ; chez le lapin, l'injection sous-cutanée amène une tumeur remplie de pus, qui se vide et rétrocède sans laisser de trace. Dans le pus, on trouve des globules du parasite, mais rares, de formes irrégulières, et impossibles à ensemençer.

La levure paraît être tuée par la réaction inflammatoire développée dans le tissu cellulaire du lapin. Celui-ci se montre d'ailleurs réfractaire à d'autres modes d'inoculation. Recevant directement la culture dans les veines, il survit à cette opération sans accuser aucun trouble. Un animal injecté à forte dose par la veine auriculaire en septembre 1895 est encore en vie actuellement.

Les espèces particulièrement sensibles à notre levure sont les rats, les souris et le chien. Chez le rat blanc, le parasite produit infailliblement dans le tissu cellulaire une tumeur véritable, dont l'évolution, lente au début, devient brusquement très active au bout de 8 à 10 jours. Ce néoplasme ressemble à l'œil nu absolument aux tumeurs observées chez l'homme : l'examen microscopique confirme cette identité.

Les résultats que nous avons obtenus dans 20 inoculations

ont constamment reproduit les mêmes variétés d'accidents qui peuvent se résumer dans les exemples suivants :

Expérience I. — Rat blanc de forte taille, inoculé le 30 août 1895, avec une culture sur pomme de terre glycinée : on injecte une petite quantité de semence, ce qui tient sur l'œillet de l'aiguille de platine.

Le 22 septembre, légère tuméfaction au point d'inoculation, l'animal ne présente aucun trouble apparent.

Le 15 octobre, tumeur saillante grosse comme un œuf. — 26 octobre, tumeur comme un gros œuf de canard. La peau commence à s'ulcérer.

L'animal est sacrifié et le contenu de la tumeurensemencé donne des cultures pures du microorganisme.

Expérience II. — Rat blanc de très forte taille, inoculé le 9 novembre, avec une culture datant de 14 jours et provenant du rat précédent. Cet animal survit.



En janvier 1896 il porte à la nuque une énorme tumeur qui lui masque presque la tête. Cette néoformation s'ulcère et se vide peu à peu de son contenu. En février il se produit à la périphérie un sillon d'élimination et la poche tout entière déjà ratatinée se détache et tombe. L'animal est encore en vie.

Expérience III. — Rat blanc inoculé le 30 octobre avec culture venant du rat n° 1 et datant de 4 jours.

Le 9 novembre, la tumeur devient bien saillante. Le 2 février l'animal meurt.

On trouve à l'autopsie, les poumons, la rate et les reins bourrés d'emboles parasitaires. Les poumons sont volumineux, durs et rigides comme dans l'hépatisation, et sont tachetés d'un semis de points blancs si nombreux qu'ils couvrent presque toute la plèvre. La rate et les reins sont également couverts de petits grains blancs disséminés faisant légèrement saillie à la surface. Le cerveau ne présente aucune altération. Tous les organes infectés

donnent des cultures pures du microorganisme. Le sangensemencé reste stérile.

Chez la souris grise l'inoculation donne également des proliférations abondantes du parasite dans le tissu cellulaire.

Dans un cas type nous avons obtenu des tumeurs sous-cutanées multiples avec une culture datant de 3 jours et provenant d'un rat infecté. L'animal fut couvert de petites tumeurs cohérentes de la grosseur d'une noisette, s'étendant depuis la nuque, point d'inoculation, jusqu'au museau et à la racine des pattes antérieures. Cette souris meurt au bout d'un mois. Les tumeurs donnent des cultures pures de la levure, mais le sang n'en renferme pas. On y trouve cependant un petit coccus qui n'a rien de commun avec le parasite sous-cutané. Ce fait s'est renouvelé avec toutes les souris mises en expérience.

Il semble donc que la lésion locale prédispose les souris grises à des infections secondaires spontanées. Elles meurent de maladie intercurrente avant que le parasite sous-cutané ne soit parvenu à les infecter.

La souris blanche paraît réceptive comme le rat. Il se développe chez elle des tumeurs sous-cutanées sans infection immédiate. Un animal inoculé le 26 mai dernier est encore en vie actuellement, au bout de 22 jours, et porte de chaque côté, sous la nuque, deux masses néoplasiques assez considérables.

Chez le chien, l'effet des inoculations varie avec la dose.

Avec une petite quantité de semence, il se développe dans le tissu cellulaire de la nuque une simple induration qui persiste pendant 8 à 10 jours et disparaît ultérieurement sans laisser de traces.

Avec des quantités plus considérables de semence les résultats sont différents.

Un chien inoculé dans ces conditions, le 19 août 1895, dans la région de la nuque, présente les jours suivants une induration de la grosseur d'une noix avec empatement périphérique. Le sixième jour l'empatement diminue; le huitième jour, il se forme assez brusquement un œdème considérable qui gagne jusqu'au museau et envahit même les paupières.

L'animal est sacrifié. Au point d'inoculation, le tissu cellulaire est rempli de pus sanguinolent renfermant une grande quantité du parasite. Le tissu cellulaire est nécrosé et limite une

poche anfractueuse qui, par des trajets irréguliers, s'étend jusque dans la région parotidienne.

Il ne nous a pas été possible dans les expériences précédentes d'entreprendre une étude complète et méthodique de la virulence de notre levure. Ce travail nous aurait entraîné beaucoup trop loin et nous le réservons pour une publication ultérieure. Il s'agissait simplement ici d'établir l'action pathogène bien réelle de notre microorganisme, et de démontrer qu'il est bien l'agent des accidents observés chez l'homme, en reproduisant des lésions identiques chez les animaux. Nous croyons qu'à ce point de vue nos expériences sont suffisamment concluantes.

En résumé, le parasite que nous étudions est pathogène pour le rat blanc, la souris grise et la souris blanche, animaux chez lesquels il produit des lésions sous-cutanées étendues, d'énormes végétations locales qui tantôt guérissent spontanément, tantôt entraînent la mort. Celle-ci survient chez le rat blanc par infection chronique, avec production dans les organes de foyers métastatiques, mode d'envahissement qui rappelle celui de la carcinose généralisée. Dans ces conditions, le microorganisme ne pullule pas dans le sang de l'animal qui succombe.

Comparaison avec les espèces connues. — Notre levure est-elle bien réellement une espèce nouvelle méritant une désignation propre? Pour ce qui est de l'analogie des levures décrites par San-Felice, la question est facile à trancher.

La variété qui fait l'objet de notre étude diffère certainement du *Saccharomyces neoformans* comme du *Saccharomyces litogenes* de cet auteur. Il suffit de rappeler que ces parasites sont pathogènes pour le cobaye alors que le nôtre est inoffensif.

La variété décrite par Busse se rapproche incontestablement beaucoup de la nôtre. Il existe cependant des caractères différentiels bien tranchés. La levure de Busse pousse sur sérum sanguin et donne parfois des voiles dans les liquides, la nôtre ne se développe pas sur sérum et pousse toujours en dépôt sédimenteux dans les liquides, sans trace de pellicule superficielle.

Le microorganisme de Busse donne en bouillon ordinaire un dépôt épais et crémeux, le nôtre s'y développe à peine et ne fournit qu'un dépôt floconneux, léger.

Enfin nous ne voyons nulle part que Busse ait produit des végétations énormes comme celles que nous signalons. Busse

parle bien d'une grosseur au point d'inoculation, mais non pas d'une tuméfaction envahissante comme celle que nous observons chez le rat, la souris et l'homme. Comme notre parasite se développe de préférence dans le tissu cellulaire sous-cutané et que c'est là qu'il produit les lésions les plus typiques, nous proposons de lui donner le nom de *Saccharomyces subcutaneus tumefaciens*.

MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES DES TISSUS

Chez l'homme, les tumeurs¹ parasitaires ont un aspect spécial. Ce sont des masses molles, laissant échapper à la coupe une substance muqueuse et collante, qui fit croire chez notre malade à l'existence d'un myxo-sarcome fortement ramolli. Le contenu du néoplasme n'est formé réellement que par des tractus de tissu cellulaire infiltré et comme dissocié par l'énorme végétation du parasite. Celui-ci est tellement abondant qu'il forme, par places, la presque totalité de la masse et lui donne par ses capsules gélinées la consistance muqueuse déjà signalée.

Les débris de tissu qu'on trouve au centre du néoplasme sont simplement des cellules du tissu conjonctif, quelques fibres lamineuses, et des capillaires sanguins entourés par places d'une infiltration abondante de leucocytes. Ces divers éléments circonscrivent les mailles d'un réseau dans lequel se logent les grosses sphères du parasite. Tout le contenu de la tumeur présente une structure identique et n'offre en somme que peu de modifications histologiques à étudier.

Il en est tout autrement des parois de la poche parasitaire. En cette région on trouve, entre les tissus sains et malades, une zone de transition dans laquelle existent des altérations histologiques plus accusées. On constate, en effet, dans la paroi de la tumeur, au voisinage immédiat des parties envahies, une couche de tissu où prédomine une infiltration de petites cellules. Au delà, en se rapprochant des tissus intacts, existe une couche de fibres lamineuses bien conservées.

La figure 6 (pl. V) représente un point de cette dernière région

1. Nous emploierons au cours de cette description les mots : tumeur, néoplasme, à défaut d'autres; toutefois il est bien entendu qu'il ne s'agit nullement ici de tumeurs ou de néoplasmes au sens histologique du mot, mais de simples végétations parasitaires au sein des tissus.

où l'on voit encore des trainées de cellules s'infiltrer dans les interstices des faisceaux conjonctifs. Les parasites sont en général logés dans des fissures du tissu ou dans des lacunes remplies d'un dépôt de fibrine granuleuse, qui semblent être des espaces lymphatiques.

Ailleurs ils se trouvent disséminés au milieu d'un tissu constitué par des petites cellules étroitement serrées les unes contre les autres. Ces éléments sont en partie des leucocytes immigrés, ainsi que le démontre l'état d'intégrité des fibres lamineuses et des cellules conjonctives au voisinage immédiat des zones d'infiltration cellulaire.

Comme le montre notre figure 6, les noyaux des cellules conjonctives appliquées sur les faisceaux ne laissent voir aucun indice de prolifération cellulaire. Ce tissu paraît conserver son aspect normal au milieu de l'envahissement de leucocytes qui s'infiltré dans tous les interstices. Ce fait n'est cependant pas absolument constant. Il existe quelques points dans nos coupes où les cellules fixes paraissent gonflées, avec un noyau plus volumineux, et semblent contribuer à produire un véritable tissu de nouvelle formation.

En général, dans la zone d'infiltration leucocytaire, les cellules se tassent autour du parasite et prennent aussi par places un aspect épithélioïde. Elles affectent d'ailleurs des dimensions très variables et se transforment même en grandes cellules géantes pourvues d'une couronne de noyaux périphériques ou d'un amas nucléaire central (fig. 6 *m*).

Un certain nombre de ces grandes cellules renferme des débris du parasite à l'état d'inclusion cellulaire (*o*). Le microorganisme logé dans le corps des cellules géantes perd sa capsule gélifiée et se réduit à une petite sphère *o* rétractée, qui tantôt se colore encore en quelques points, tantôt reste réfractaire à tous les colorants (*o'*).

On trouve enfin constamment dans les tissus humains des formes bourgeonnantes du parasite remplies de grains de chromatine à côté d'autres qui semblent vides.

Chez les animaux réceptifs, tel que le rat, les modifications des tissus au contact du parasite sont toujours très peu accusées.

La coupe d'une tumeur sous-cutanée présente chez le rat blanc le même aspect que chez l'homme. Ce n'est pas un néo-

plasme, mais une véritable culture du microorganisme sur le vivant. Toute la masse n'est formée que par une énorme agglomération de parasites munis de leurs capsules gélifiées et tellement tassées que c'est à peine si l'on voit au milieu d'eux les vestiges du tissu conjonctif envahi. Il existe pourtant, et on le retrouve plus abondant au voisinage de la surface de la tumeur. C'est cette région que représente notre figure 5.

Ce qui frappe ici, c'est qu'on ne retrouve pas chez le rat une zone d'infiltration leucocytaire comme chez l'homme. Les espaces laissés libres par les parasites sont occupés par des cellules fixes du tissu conjonctif à forme étoilée ou polygonale, suivant la place dont elles disposent. La surface de notre coupe répond directement à la peau qui a été enlevée pour faciliter la section au microtome. On y distingue des petites déchirures qui font nettement apparaître les formes étoilées et ramifiées des cellules constituant la masse du tissu. A mesure qu'on s'éloigne de la surface de la tumeur, les parasites se tassent davantage, tandis que les cellules conjonctives prennent des formes de plus en plus grêles et effilées, circonscrivant les mailles d'un réseau que viennent renforcer par places quelques fibrilles conjonctives, des artérioles et des capillaires.

En somme, ce qu'il y a de curieux dans cette énorme végétation locale du parasite, c'est qu'elle s'accomplit sans provoquer aucune réaction au sein des tissus. C'est à peine si, vers la surface ou le long des vaisseaux, on retrouve quelques traces d'infiltration leucocytaire; les tissus paraissent avoir subi passivement l'envahissement du microorganisme.

Cette absence absolue de réaction des éléments histologiques se retrouve également dans la coupe des organes envahis.

Dans un poumon de rat embolisé (fig. 7.), et tellement envahi qu'il semble ne former qu'un bloc de parasites, les tissus sont à peine modifiés.

On peut voir, dans la coupe représentée, comment le microorganisme pénètre l'organe. Il s'y accumule en effet tout d'abord dans les travées interalvéolaires (*p*), qui s'épaississent énormément au contact de cet envahissement (*q*). Bientôt le parasite soulève la paroi (*t*) et fait saillie peu à peu dans la lumière de l'alvéole en s'entourant d'une zone de cellules endothéliales (*l*). Il tombe en dernier lieu dans l'alvéole même, entraînant avec lui

un petit amas de cellules (s). Les cavités du poumon sont ainsi graduellement envahies et en certains points totalement obstruées par des masses de parasites accompagnées de quelques éléments cellulaires.

Tout ce processus évolue cependant avec un calme étonnant : il n'existe dans le poumon, ni congestion, ni hémorrhagies, ni exsudats abondants, ni foyers inflammatoires. Rien qu'un peu de pneumonie desquamative et d'épaississement des travées interalvéolaires.

Dans la coupe du rein et de la rate, on observe les mêmes faits. Les parasites forment ici des amas disséminés sans que les tissus paraissent subir aucune modification importante.

CONCLUSIONS

1° Le parasite trouvé par nous dans le tissu cellulaire de l'homme est une levure analogue à celles décrites par Busse et San-Felice, mais distincte de ces variétés par des caractères bien tranchés. Nous lui donnons le nom *Saccharomyces subcutaneus tumefaciens*.

2° Notre parasite se présente sous la forme d'une cellule libre ou munie d'une capsule gélatinée suivant qu'elle pousse en culture ou dans les tissus vivants. La forme encapsulée n'est pas exclusivement propre à l'état parasitaire, on la retrouve dans les vieilles cultures en milieu sucré.

3° Le *Saccharomyces subcutaneus tumefaciens* pousse particulièrement bien sur les milieux acides et neutres. Il intervertit le saccharose et produit à ses dépens de l'alcool éthylique et de l'acide acétique.

Il donne les mêmes réactions avec le moût de bière naturel et attaque le glycose quand ce dernier est dissous dans l'eau de levure. Il n'attaque dans aucune solution artificielle le maltose ni le lactose à 37°.

4° Le *Saccharomyces tumefaciens* produit chez l'homme des tumeurs sous-cutanées multiples qui peuvent s'ulcérer et ressemblent à l'œil nu à des myxo-sarcomes ramollis. A l'examen histologique, ces tumeurs n'offrent aucune texture histologique, et se décèlent comme n'étant qu'une énorme infiltration parasitaire s'accompagnant, surtout au niveau des limites des tissus

sains, d'une diapedèse et d'un envahissement leucocytaire abondant.

5° Le *Saccharomyces subcutaneus* est pathogène pour le rat, la souris, le chien et le lapin. Il reproduit chez le rat et la souris des tuméfactions sous-cutanées analogues à celles de l'homme, et peut tuer l'animal par infection chronique.

EXPLICATION DES FIGURES (PL. IV ET V.)

Fig. I. — Culture sur gélose, au bout de 48 heures d'étuve à 37° : on y voit une forme de multiplication anormale *x*.

Fig. II. — Culture en solution de peptone acide et sucrée. *

Formes en chapelets et forme sphérique. Rareté des grains réfringents.

Fig. III. — Culture vieille de 4 mois 1/2 en solution de peptone acide sucrée. — Reproduction de la forme parasitaire.

Fig. IV. — Formes parasitaires diverses munies de grosses capsules gélifiées. Coloration par le vert de méthyle acétique.

1. — Cellule où le protoplasme chargé de grains de chromatine forme une calotte au niveau du pôle germinatif et s'étend dans le bourgeon. — *c*) Gros grain réfringent. (*h*) Substance incolore représentant des enclaves.

2. — Cellule où les grains de chromatine remplissent tout le protoplasme.

3 et 6. — Cellule où les grains de chromatine sont disposés en couronne autour d'un espace clair central.

5. — Cellule ne contenant que deux petits grains de chromatine et paraissant vide.

Fig. V. — Coupe de la tumeur d'un rat au niveau de la surface. La peau a été enlevée pour faciliter la coupe. Les parasites sont séparés par des cellules fixes du tissu conjonctif.

Fig. VI. — Coupe des parois de la tumeur humaine montrant la réaction du tissu au contact du parasite, *m*, cellules géantes contenant des parasites *n*.

Fig. VII. — Coupe d'un poumon de rat embolisé, montrant les travées interalvéolaires épaissies logeant des nids de parasites qui, par places, tombent dans l'alvéole.

Indications générales. — *A*. Cellule de levure forme libre. — *B*. Cellule de levure, forme en chaînette, fréquente en milieux sucrés acides. — *D*. Cellule de levure avec capsule hyaline, forme du parasite dans les tissus ou dans de vieux milieux sucrés. — *a*. Paroi propre. — *b*. Amas formé par des petits grains de chromatine disséminés dans le cytoplasme. — *c*. Grain réfringent. Substance nutritive de réserve logée dans le protoplasme. — *d* Espace clair, enclave protoplasmique. — *f*. Bourgeon en voie de développement. — *g*. Capsule gélifiée. — *h*. Espace clair homogène ne se colorant pas. Vacuole. — *m*. Cellule géante. — *n*. Cellules du tissu conjonctif

en prolifération. — *o*. Parasite phagocyté logé dans une cellule géante. — *o'*. Débris de parasite dans une cellule géante ne se colorant plus. — *p*. Travées interalvéolaires du poumon épaissies. — *q*. Nids de parasites logés dans les travées. — *t*. Parasites faisant saillie dans l'alvéole et soulevant la paroi. — *s*. Parasites tombés dans l'alvéole avec cellules endothéliales. — *r*. Bronche contenant des parasites. — *v*. Cellule du parasite vide. — *x*. Forme de bourgeonnement anormale.

BIBLIOGRAPHIE

1. — TROISIER et ACHALME. Sur une angine causée par une levure et cliniquement semblable au muguet. *Arch. de méd. exp.*, V, p. 29-37, 1893.
 2. — BUSSE. Ueber Saccharomycosis hominis. *Archiv. für Path. und Phys.* Bd. 140, H 13-23, *Ibid.* Bd. 144, H 2, S 360.
 3. — CURTIS. *Presse médicale*, 28 sept. 1893, et *Société de Biologie*, 9 nov. 1893.
 4. — SAN-FELICE. Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten. *Zeitschrift für Hygiene*, tome XXI, p. 32, 1893, et tome XXI, p. 394, 1896.
 5. — MAFFUCCI et SIRLEO. Osservazione ed esperimenti ad un blastomiceto patogeno con inclusione dello stesso nelle cellule dei tessuti patologici. *Policinico*, 1893, vol. II, 1893, p. 138.
 6. — LYDIA RABINOWITSCH. Untersuchungen uber pathogene Hefearten. *Zeitschrift für Hygiene*, tome XXI, p. 41, 1893.
-

LES TOXINES ET L'ÉLECTRICITÉ

PAR L.-A. MARMIER

L'électricité agit-elle, par elle-même, sur les toxines bactériennes, indépendamment de tout autre phénomène secondaire, telle est la question à laquelle MM. Smirnow et Kruger, pour les courants continus¹, MM. d'Arsonval et Charrin, pour les courants à haute fréquence², ont répondu par l'affirmative.

Dans ses trois mémoires sur cette question, M. Smirnow signale bien des actions chimiques accompagnant l'électrolyse de la toxine diphtérique, telle la décomposition des sels de cette substance; mais ce n'est là, pour lui, qu'une chose accessoire, et le passage du courant électrique dans la toxine lui semble être la condition nécessaire et suffisante de la formation de son antitoxine.

De même, MM. d'Arsonval et Charrin attribuent à des ébranlements moléculaires très rapides, produits au sein du liquide par les courants à haute fréquence, les atténuations qu'ils découvrent dans la toxine diphtérique traitée par ces courants.

Il pouvait être intéressant de vérifier les observations de ces divers expérimentateurs; c'est ce que j'ai tenté ici.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à MM. Violle et Brillouin, maîtres de conférences à l'École normale supérieure, qui m'ont admis dans leur laboratoire. Je ne saurais trop remercier également mon maître, M. le Dr Roux, pour les précieux encouragements qu'il ne cesse de me prodiguer. Enfin je ne puis oublier tout ce que je dois à mon ami M. Henri Abra-

1. G. A. SMIRNOW, Ueber die Behandlung der Diphterie mit Antitoxinen, die ohne Vermittelung des thierischen Organismus darstellbar sind. (*Berliner klinische Wochenschrift*, 23 juillet 1894, p. 683.)

G. A. SMIRNOW, Ueber die Behandlung der Diphterie mit künstlich dargestellten Antitoxinen. (*Berliner klinische Wochenschrift*, 1893, p. 645 et 675.)

S. KRÜGER, Ueber die chemische Wirkung der Elektrolyse auf toxische und immunisirende Bacteriensubstanzen. (*Deutsche medicinische Wochenschrift*, 23 mai 1893, p. 331.)

2. D'ARSONVAL et CHARRIN, Action des courants à haute fréquence sur les toxines bactériennes. (*Comptes rendus, Académie des Sciences*, 10 février 1896.)

ham qui a bien voulu m'aider dans l'exécution de ce travail et a été ainsi pour moi un précieux collaborateur.

COURANTS CONTINUS

Jusqu'à présent, on ne connaissait qu'un seul mode de production des antitoxines : celui mis en usage pour la sérothérapie. M. Smirnow fait dériver l'antitoxine de la toxine, par un procédé physique. Pour cela, il soumet la toxine à l'électrolyse dans un tube en U, muni d'un robinet dans la partie recourbée. Voici ce qu'il remarque alors : Par électrolyse d'une culture en bouillon, le liquide devient plus foncé au pôle négatif et plus clair au pôle positif. Puis, au bout d'un certain temps, le liquide s'éclaircit à la cathode. M. Smirnow fait remarquer que la principale difficulté de la préparation des antitoxines par ce procédé consiste dans la détermination de la durée du courant nécessaire pour arriver au résultat le plus favorable. Il est préférable d'employer un courant faible pendant longtemps; un courant de grande intensité pendant peu de temps donnant de mauvais résultats. Toutefois, une fois l'antitoxine formée, l'action ultérieure du courant, même faible, paraît diminuer les propriétés curatives de la liqueur. Il recommande d'employer un courant de 80 milliampères pendant au moins 16 à 18 heures. Il lui semble que c'est lorsque le liquide alcalin de la cathode arrive au maximum de décoloration que l'on doit interrompre l'opération pour avoir l'antitoxine la plus efficace. Ainsi un lapin, inoculé préalablement avec une culture diphtérique, a un abaissement plus ou moins notable de la température, deux ou trois heures après l'inoculation de 8 à 10 c. c. de la toxine électrolysée.

Voulant traiter par le même procédé des cobayes infectés, il ne réussit pas. Il trouve alors que la durée de l'électrolyse doit être déterminée, en outre, par un degré convenable d'acidité de l'anode, cette acidité étant exprimée par le nombre de centimètres cubes de la solution normale de soude nécessaire pour neutraliser 1 c. c. de la liqueur. Il faut arriver à une acidité de 1,2 pour obtenir une survie des cobayes traités sur les cobayes témoins.

Il remarque de plus que, pour obtenir une bonne antitoxine, il est nécessaire que l'on ajoute à la fin de l'opération certaines substances à la liqueur, de façon à ce que la teneur du liquide

en sels soit la même avant et après l'électrolyse. Il est également bon d'attendre plusieurs jours entre la fin de l'électrolyse et le moment où l'on ajoute ces substances.

Plusieurs des cobayes traités par M. Smirnow ont survécu et l'auteur attribue ces succès à ce que les multiples conditions qu'il a assignées à l'électrolyse se sont trouvées réalisées dans ces cas. Tout cela est évidemment peu précis.

Quand on répète cette expérience, on constate, comme il était naturel de s'y attendre, une odeur de chlore assez forte. La toxine contient toujours en effet une proportion plus ou moins grande de sel marin. On sait quels oxydants énergiques sont les liquides obtenus par l'électrolyse des solutions de ce sel, par suite de la formation possible d'hypochlorites, chlorates, etc.

Il faut ajouter que l'oxygène électrolytique contient un peu d'ozone et que les électrodes peuvent être le siège d'actions thermiques qui ne sont pas toujours négligeables.

Si l'on songe maintenant à la fragilité des toxines vis-à-vis d'agents oxydants tels que ceux qui se forment dans cette opération, on ne sera pas étonné de la rapide disparition de ces poisons quand on soumet à l'électrolyse les liquides où ils se trouvent dissous. On arrive ainsi assez vite à une liqueur qui n'est plus toxique pour les animaux (du moins à des doses inférieures à 20 c. c.); à ce moment, il ne m'a pas semblé que la liqueur eût la moindre propriété immunisante ou curative. Mais si l'on prolonge la durée de l'électrolyse, comme le recommande M. Smirnow, on arrive à un point où l'acidité du pôle positif est neutralisée par un volume à peu près égal d'une solution normale de soude. J'ai dosé par l'acide arsénieux et l'iode la quantité d'hypochlorite restant à ce moment dans la liqueur.

J'ai ainsi trouvé pour un liquide, dont 1 c. c. était neutralisé par 0^{cc},9 d'une solution normale de soude, une quantité d'hypochlorite titrant 2^{gr},36 (ou 0^l,95) de chlore par litre. La toxine est donc transformée en une véritable solution d'hypochlorites.

Les expériences de M. Smirnow doivent donc être vraisemblablement rapprochées d'autres expériences inédites faites par M. L. Martin, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, sur la valeur curative des hypochlorites dans la diphtérie.

Voici d'ailleurs, entre autres, deux expériences que M. Martin a eu l'obligeance de me communiquer.

EXPÉRIENCE : On injecte sous la peau d'un cobaye de 440 grammes 4/10 c. c. de toxine diphtérique, dose qui tue en 40 heures les cobayes témoins.

24 heures après l'inoculation de la toxine, on injecte au cobaye 1 c. c. 5 d'une solution d'hypochlorite de soude à 1/30, contenant environ 0,15 de chlore par litre. Le cobaye a une survie de 3 jours.

EXPÉRIENCE : On inocule sous la peau d'un cobaye 4/3 c. c. d'une culture diphtérique virulente âgée de 24 heures. Puis, 2 heures plus tard, tout autour du point d'inoculation, on injecte de petites quantités d'hypochlorite de soude. Le cobaye a survécu un mois.

Il faut ajouter que, dans les expériences de M. Martin, les quantités d'hypochlorite injectées ont été certainement plus faibles que dans les expériences de M. Smirnow.

En résumé, il ne semble donc pas que les courants continus aient amené, indépendamment de toute action chimique secondaire, des modifications dans la toxine diphtérique.

COURANTS ALTERNATIFS A HAUTE FRÉQUENCE

Pour éliminer de l'action de l'électricité sur les toxines ces influences secondaires d'ordre chimique, MM. d'Arsonval et Charrin ont été conduits à adopter les courants alternatifs à haute fréquence. Dans leurs expériences, la fréquence employée, calculée d'après la formule de lord Kelvin, était de 225,000 par seconde. L'intensité efficace du courant traversant la toxine était de 750 milliampères et la densité moyenne du courant de 250 milliampères par centimètre carré. La toxine était contenue dans un tube en U ; le courant était amené par deux fils de platine et le tube en U était plongé dans un vase d'eau glacée afin d'éviter tout échauffement du liquide pendant le passage du courant.

En traitant de cette façon, pendant un quart d'heure, une toxine diphtérique très active, ils ont pu en injecter ensuite 2 c. c. 5 à trois cobayes et avoir chez l'un une survie de 3 jours sur les témoins, les deux autres étant encore vivants douze jours après l'inoculation.

Trois autres cobayes furent traités de la même façon, puis inoculés au bout de 7 jours avec 0 c. c. 5 de culture diphtérique. L'un d'eux seulement mourut, les deux autres étaient encore vivants 7 jours après l'inoculation.

Les conclusions du travail de MM. d'Arsonval et Charrin furent donc les suivantes :

- 1° La haute fréquence atténue les toxines bactériennes ;
- 2° Les toxines ainsi atténuées augmentent la résistance des animaux auxquels on les injecte.

Dans mes expériences, je me suis servi du dispositif employé par MM. d'Arsonval et Charrin.

Un courant alternatif passe dans le primaire d'une bobine Carpentier grand modèle. Le secondaire de la bobine est relié aux armatures extérieures de deux grandes jarres et à un micro-mètre à étincelles, entre les boules duquel on souffle l'arc.

Les armatures intérieures de ces condensateurs sont reliées par un solénoïde. Des deux extrémités du solénoïde partent, en dérivation, deux fils amenant le courant aux deux extrémités du tube contenant la toxine.

Les condensateurs employés étaient des jarres du commerce de 14 centimètres de diamètre et recouvertes de papier d'étain sur 35 centimètres de hauteur. L'épaisseur du verre était de 3 millimètres.

Le solénoïde était constitué par 54 spires d'un fil de 2^{mm}, 2 de diamètre, enroulé sur une éprouvette à pied de 76 millimètres de diamètre. Le fil occupait sur cette éprouvette une longueur de 15 centimètres et était soigneusement isolé à la paraffine. En outre, il y avait 1^m, 20 de ce fil de cuivre pour relier le solénoïde aux armatures des condensateurs.

D'après ces mesures, le nombre des oscillations, calculé d'après la formule de lord Kelvin,

$$T = 2\pi \sqrt{CL}$$

où T représente la durée de l'oscillation, C, la capacité du condensateur, L, le coefficient de self-induction du solénoïde, serait au moins de l'ordre de 500,000 par seconde, si tant est que cette formule soit applicable au cas actuel.

Dans chaque expérience, l'intensité efficace du courant était mesurée au moyen d'un calorimètre, constitué par un tube en U contenant de l'eau légèrement salée. Le tube était placé dans une enceinte de façon à diminuer la chaleur perdue par rayon-

nement; cette quantité de chaleur était d'ailleurs évaluée chaque fois. Cet appareil était gradué par comparaison avec des courants continus.

En mettant en dérivation aux pôles du solénoïde un tube en U contenant de la toxine, on voit de légères bulles gazeuses se former le long des fils de platine. De plus, si l'on se place dans l'obscurité, on remarque qu'il se produit des étincelles au sein de ces bulles. Aussi, pour éviter tout échauffement local par suite de la présence d'électrodes constituées par des fils métalliques, j'ai remplacé, au contact de la toxine, ces fils par des lames de platine. Dans ces conditions, les étincelles disparaissent et on ne distingue plus de dégagement gazeux. Il se produit, peut-être, encore une légère électrolyse, mais, avec la toxine dont je me suis servi, je n'ai pas pu mettre en évidence la formation d'hypochlorites, même après une demi-heure d'expérience, faite comme il sera indiqué plus loin.

Faisant alors passer le courant dans un tube en U de 2 centimètres de diamètre, on a, en quelques instants, une ébullition violente du liquide. Il est donc nécessaire de refroidir le tube contenant la toxine. Comme l'ont fait MM. d'Arsonval et Charrin, j'ai mis l'appareil dans l'eau glacée.

Malgré cela, et en employant un courant de même densité que celui dont ils se sont servis, l'échauffement produit par le courant est encore assez puissant pour amener le liquide à l'ébullition en moins de 4 minutes.

Pour se rendre compte de la façon dont se produit cet échauffement, on a introduit, dans une des branches du tube en U, un tube de verre concentrique, de façon à partager le liquide en deux couches: une annulaire périphérique, dans laquelle plongeait l'électrode en platine, et une intérieure, communiquant librement en haut et en bas avec le reste du liquide. Faisant alors passer le courant, on constate que, lors de l'ébullition, les bulles de vapeur partent de toutes les surfaces, aussi bien des fils métalliques et des parois du tube en U que des parois extérieure et intérieure du tube intérieur. La toxine est donc échauffée par le courant dans toute sa masse.

Il est certain que dans l'expérience faite par MM. d'Arsonval et Charrin la toxine n'avait pas chauffé comme dans l'expérience que je viens de rapporter. Il suffit en effet pour cela d'une moin-

dre épaisseur des parois du tube en U et aussi d'une plus grande proportion de sels dans la toxine employée. Mais, étant donnée la sensibilité de ces corps à la chaleur, il importait, pour répéter leur expérience, de se mettre le plus possible à l'abri d'une élévation un peu grande de la température.

Pour cela, j'ai mis la toxine dans un tube en U à longue branche horizontale, de faible diamètre, et en verre mince, de façon à augmenter le refroidissement. Les portions verticales de l'appareil étaient composées de deux parties : une partie inférieure, courte, était la continuation de la branche horizontale ; une partie supérieure de quelques centimètres offrait un diamètre un peu plus considérable et était reliée à la précédente par un tube de caoutchouc. La toxine remplissait cet ensemble jusqu'à une hauteur de quelques centimètres dans le tube large où le courant était amené par des lames de platine. On avait ainsi un appareil avec de véritables *électrodes liquides*. Après la fin de l'expérience, les caoutchoucs de communication étaient fermés par des pinces, et l'on pouvait ainsi inoculer à différents animaux : d'une part, la partie supérieure de la toxine contenue dans les larges tubes verticaux, et d'autre part celle qui était contenue dans le tube fin horizontal.

Tout l'appareil était maintenu dans de l'eau glacée pendant le passage du courant.

J'ai alors fait une expérience avec un potentiel explosif de 13,000 volts, le tube horizontal ayant une capacité de 9 centimètres cubes et une longueur de 55 centimètres ; le diamètre des tubes verticaux était de 7 millimètres.

L'intensité efficace du courant, mesurée d'après l'échauffement du calorimètre, a été de 60 milliampères, ce qui donne une densité de courant de 360 milliampères par cent. carré pour la portion inférieure du tube, et de 160 milliampères par cent. carré pour la portion supérieure.

Un thermomètre plongeant dans la partie supérieure de la toxine diphtérique a marqué 81° en 12 minutes.

Étant donnée la température atteinte ici par la toxine diphtérique, j'ai jugé inutile de l'inoculer à des animaux. Mais cette expérience montre que les précautions prises contre l'échauffement ne sont pas encore suffisantes. Aussi, ai-je soumis la toxine à l'action du courant de façon intermittente, augmentant plus ou

moins la longueur des arrêts, de façon à obtenir un refroidissement plus efficace par l'eau glacée.

Outre l'intensité efficace du courant, il pouvait être intéressant d'avoir la quantité d'énergie dépensée dans le liquide soumis à l'action de l'électricité. Pour mesurer cette quantité d'énergie, après chaque expérience la toxine était remplacée par une colonne d'eau présentant la même résistance que la toxine. En mesurant l'échauffement de cette colonne d'eau, rien n'était plus simple que de calculer l'énergie dépensée.

Mes expériences ont porté sur du venin de serpents et sur les toxines diphtérique et tétanique.

A. — EXPÉRIENCES FAITES AVEC LE VENIN DE SERPENTS.

M. Phisalix, répétant sur du venin de serpents les expériences que MM. d'Arsonval et Charrin avaient faites avec la toxine diphtérique, arrive à la conclusion que les courants à haute fréquence atténuent le venin ¹.

Je me suis servi, pour mes expériences, d'un mélange de venins que M. le docteur Calmette, directeur de l'Institut Pasteur de Lille, a eu l'amabilité de m'envoyer. Ce venin est le même que celui qui sert à immuniser les chevaux pour obtenir le sérum anti-venimeux. C'est un mélange de venins de *Cobra*, de *Bothrops lanceolatus* de la Martinique, d'*Hoplocephalus* d'Australie et de *Pseudechis porphyriacus* d'Australie. Ce mélange n'est pas modifié par le chauffage jusqu'à 90°; mais, à partir de cette température, il perd progressivement de son activité.

Ce venin fut soumis à l'action des courants à haute fréquence en employant le dispositif décrit ci-dessus.

EXPÉRIENCE I. — La partie inférieure du tube à électrolyse contient 2^{cc}, 7 de venin sur une longueur de 14 centimètres. Le diamètre des tubes supérieurs est de 8^{mm}, 2. Le venin est soumis à l'action du courant pendant 25 minutes; il y a eu un arrêt de 3 minutes après la 7^e minute.

Le potentiel explosif était de 20,000 volts. On avait comme force électromotrice sur le venin du tube inférieur environ 1,000 volts par centimètre de longueur. Mais le venin avait une grande résistance, et, malgré cette force électromotrice considé-

1. Voir *Comptes rendus de la Société de biologie*, séance du 29 février 1896.

nable, il ne laissait passer, comme courant efficace, que 13 milliampères, correspondant à une densité de 68 milliampères par cent. carré pour le tube inférieur et de 25 milliampères par cent. carré pour les tubes supérieurs.

Le venin fut ensuite inoculé à des lapins de la façon suivante :

1. *Témoins.*

2/3 c. c. de venin tuent un lapin de 2,700 grammes en 3 heures.

1/3 c. c. de venin tue un lapin de 1,900 grammes en 4 heures.

1/3 c. c. de venin, inoculé à un lapin de 2,350 grammes, ne le tue pas, mais le lapin a été très malade.

2. *Animaux inoculés avec le venin contenu dans les larges branches verticales*

2/3 c. c. de ce venin tuent un lapin de 2,400 grammes en moins de 4 heures.

1/3 c. c. tue un lapin de 2,000 grammes en moins de 4 heures.

3. *Animaux inoculés sur le venin contenu dans la partie horizontale du tube*

2/3 c. c. tuent un lapin de 2,500 grammes en moins de 4 heures.

1/3 c. c. tue un lapin de 2,100 grammes en 4 heures.

1/3 c.c. ne tue pas un lapin de 2,350 grammes; toutefois ce lapin a été très malade : il est resté étendu sur le flanc à partir de la 3^e heure qui a suivi son inoculation. Il a été certainement plus atteint que le témoin qui avait reçu la même dose que lui et qui a résisté.

Il résulte de cette expérience qu'il n'y a eu aucune atténuation du venin par suite du passage du courant, et cela, malgré la force électromotrice à laquelle était soumis le venin, force qui est peut-être un des facteurs de l'ébranlement moléculaire.

J'ai fait une deuxième expérience en employant des courants plus intenses. Pour cela, j'ai mis dans le tube à électrolyse ce qui me restait du venin ayant servi à l'expérience I, et j'ai achevé de remplir l'appareil avec du venin frais auquel on avait ajouté un peu de sel marin pour diminuer sa résistance.

EXPÉRIENCE II. — La partie inférieure du tube à électrolyse contient 3^{cc}, 5 de venin sur une longueur de 15 centimètres environ. Le diamètre des tubes supérieurs est de 9 millimètres. Le venin est soumis à l'action du courant pendant 21 minutes et demie, dont 5 minutes et demie avec une intensité efficace bien supérieure à celle des 16 dernières minutes.

Dans cette expérience, je faisais passer le courant pendant 2 minutes et je m'arrêtais 2 minutes.

Pendant les 16 dernières minutes, l'intensité efficace du

courant a été de 64 milliampères, ce qui correspond à une densité de 270 milliampères par cent. carré pour le tube inférieur et de 100 milliampères par cent. carré pour les tubes supérieurs.

L'énergie dépensée dans le venin a été, par minute, de 235 petites calories dont 210 pour la partie inférieure, ce qui fait, pour cette partie, 60 petites calories par minute et centimètre cube. Cette quantité d'énergie est donc telle qu'il y aurait eu, dans le venin, une élévation de température de 1 degré par seconde sans le refroidissement.

Voici les résultats des inoculations du venin aux animaux après le passage du courant.

1. *Témoins* : Les témoins sont les mêmes que ceux de l'expérience I.

2. *Animaux inoculés avec la partie supérieure du venin* :

1 c. c. tue un lapin de 2,280 grammes en moins de 3 h. 30.

2/3 c. c. tuent un lapin de 2,100 grammes en moins de 2 heures.

1/3 c. c. tue un lapin de 1,920 grammes en 3 h. 30.

3. *Animaux inoculés avec la partie inférieure du venin* :

1/2 c. c. tue en 6 heures un lapin pesant 2,450 grammes.

6/15 c. c. tuent en 10 heures un lapin pesant 2,500 grammes.

6/15 c. c. tuent en moins de 4 heures un lapin pesant 1,870 grammes.

6/15 c. c. tuent en 3 heures un lapin pesant 1,920 grammes.

Un peu moins de 5/15 c. c. inoculés à un lapin de 2,350 grammes ne le tuent pas, mais le lapin a été très malade.

En résumé, aucune atténuation du venin n'a pu être obtenue dans ces expériences, malgré une dépense d'énergie considérable, qui aurait suffi pour faire bouillir ce liquide en quelques minutes sans le refroidissement.

B. — EXPÉRIENCES AVEC LA TOXINE DIPHTÉRIQUE.

Je ne citerai que l'expérience suivante :

EXPERIENCE III. — Le tube inférieur contient 6^{cc},2 de toxine diphtérique sur une longueur de 39 centimètres ; le diamètre du tube supérieur est de 7^{mm},2.

Le courant était interrompu de 2 à 3 minutes après chaque passage de 2 minutes.

L'intensité efficace du courant a été de 77 milliampères, ce qui donnait une densité de courant de 190 milliampères par

cent. carré pour les branches verticales et de 480 milliampères par cent. carré pour la branche horizontale.

Le courant a passé pendant 20 minutes.

L'énergie dépensée dans la toxine a été de 465 petites calories par minute, dont 390 pour la partie inférieure du liquide, ce qui fait 62 petites calories par minute et par centimètre cube.

Cette toxine fut ensuite inoculée à des cobayes. Voici les résultats des inoculations :

Doses en c. c.	Animaux témoins.	Animaux inoculés avec la partie inférieure de la toxine.	Animaux inoculés avec la partie supérieure de la toxine.
1/10		Cobaye 505 grammes Mort en 54 heures.	
2/15	Cobaye 475 grammes Mort en 22 heures.	Cobaye 520 grammes Mort en 36 heures.	Cobaye 680 grammes Mort en 56 heures.
2/15	Cobaye 540 grammes Mort en 75 heures.	Cobaye 490 grammes Mort en 60 heures.	Cobaye 420 grammes Mort en 50 heures.
2/15		Cobaye 660 grammes Mort en 50 heures.	Cobaye 620 grammes Mort en 60 heures.
4/15	Cobaye 810 grammes Mort en 60 heures.	Cobaye 780 grammes Mort en 24 heures.	
5/15			Cobaye 585 grammes Mort en 60 heures.
14/15			Cobaye 830 grammes Mort en 36 heures.

Par conséquent, il ne semble pas y avoir eu d'atténuation de la toxine diphtérique à la suite du courant à haute fréquence.

J'ai fait plusieurs expériences avec cette substance, en employant des courants dont les densités ont varié de 110 à 600 milliampères par cent. carré. En prenant les précautions que j'ai indiquées, je n'ai jamais eu le moindre abaissement de toxicité de cette substance, et cela, malgré de grandes dépenses d'énergie et des forces électromotrices qui ont atteint 1,000 volts par centimètre de longueur de la toxine.

C. — EXPÉRIENCES AVEC LA TOXINE TÉTANIQUE.

Ces expériences ont été faites avec de la toxine tétanique qui a été gracieusement mise à ma disposition par M. Vaillard, médecin principal au Val-de-Grâce. Je n'en citerai qu'une :

EXPÉRIENCE IV. — Le tube inférieur contient 5^{cc}, 5 de toxine tétanique. Le diamètre du tube supérieur est de 7^{mm}, 8. L'intensité efficace du courant a été de 71 milliampères, ce qui donnait une densité de 150 milliampères par cent. carré pour les branches verticales et de 520 milliampères par cent. carré pour la portion horizontale.

Le courant était interrompu de 2 à 3 minutes après chaque passage de 2 minutes; il a passé pendant 21 minutes.

L'énergie dépensée pendant cette expérience dans la toxine tétanique a été de 480 petites calories par minute, dont 430 dans la partie inférieure du tube. On avait donc, dans cette toxine, une dépense d'énergie de 76 petites calories par minute et centimètre cube.

Les résultats des inoculations ont été les suivants :

Des doses inférieures à 1/30 c. c. tuent des souris en moins de 20 heures, aussi bien celles qui ont été inoculées comme témoins que celles inoculées avec la partie inférieure de la toxine.

1/15 c. c. de la partie supérieure de la toxine tue deux souris en moins de 20 heures.

1/30 c. c. de cette même partie supérieure tue une souris en moins de 20 heures et l'autre en 25 heures.

Avec des cobayes, j'ai eu les résultats suivants :

Les animaux ayant reçu des doses inférieures à 1/30 c. c., soit de la toxine non traitée, soit de la partie inférieure de la toxine traitée, sont tous morts en moins de 36 heures.

Ceux qui ont reçu la même quantité de la partie supérieure de la toxine traitée sont morts entre la 30^e et la 68^e heure.

Je n'ai donc pas pu mettre en évidence l'atténuation de la toxine tétanique par les courants à haute fréquence.

CONCLUSIONS

Les courants continus ou alternatifs de basse fréquence détruisent les toxines bactériennes par la production d'hypochlorites et de chlore au sein de ces toxines.

Je n'ai pu obtenir la moindre atténuation de ces liquides par les courants à haute fréquence.

Le Gérant : G. MASSON.
